



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Homólogos de genes de resistencia en fríjol (*Phaseolus vulgaris*) y su aplicación en resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*

LUZ NAYIBE GARZÓN GUTIÉRREZ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Escuela de posgrados
Bogotá, Colombia
2012

Homólogos de genes de resistencia en fríjol (*Phaseolus vulgaris*) y su aplicación en resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*

LUZ NAYIBE GARZÓN GUTIÉRREZ

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Agropecuarias, área Agraria con énfasis en Fitopatología

Director:

Ph.D. OSCAR ARTURO OLIVEROS GARAY

Codirector:

Ph.D. MATTHEW W. BLAIR

Línea de Investigación:

Mejoramiento de leguminosas

Grupo de Investigación:

Horticultura

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía, Escuela de posgrados

Bogotá, Colombia

2012

Gracias a mi familia por su constante apoyo y paciencia. A mi esposo José Luis, a mi hijo que son la motivación para continuar formándome como profesional y mejorando como persona.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por estar siempre a mi lado.

A mi familia por su apoyo constante

A mi esposo por toda la comprensión, tiempo y paciencia.

A mi hijo José Luis por ser el mejor regalo que me ha dado Dios.

Al director de mi tesis el doctor Matthew Blair, el cual considero uno de los mejores investigadores y una excelente persona. Gracias por todos los conocimientos, el apoyo y el tiempo dedicado para poder culminar esta etapa.

Al director de mi tesis el profesor Oscar Oliveros, por su confianza y por creer en mi trabajo.

A los investigadores y estudiantes del laboratorio de germoplasma de frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical por toda la colaboración recibida, especialmente a Alvaro Soler, Paulo Izquierdo y Carolina Chavarro.

A los integrantes del laboratorio de Fitopatología de frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical, especialmente a Carlos Jara, Guillermo Castellanos y Gloria Mosquera, por su colaboración en las evaluaciones fenotípicas.

A los integrantes del laboratorio de Fitopatología de “University of California-Davis” por toda la colaboración y amistad recibida durante mi estancia en este prestigioso laboratorio, especialmente a Benjamin Rosen, Jinliang Gao, Noelia Carrasquilla, Anandkumar Surendrarao, Matilde Cordeiro, Mariana Pereira, Yawadee Srimake, Yuming Hu and Guyla Yoak.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia- Bogotá.

A mis amigas Rosa Lilia Ferrucho y Linda Rincón por brindarme su amistad durante mi formación posgradual y por todos los buenos consejos recibidos.

Al profesor Oscar Pérez por tiempo condecido para poder finalizar el documento y por toda la confianza que he recibido de su parte.

A los profesores Silvia Restrepo, Camilo Lopez y la doctora Pilar Moncada por el tiempo que dedicaron en la revisión del documento y por sus valiosos aportes.

A todos aquellos que de una y otra manera me han apoyado para poder llevar a término esta etapa de mi vida.

Resumen

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) es afectado por diversos patógenos que limitan su producción, por esta razón la identificación de genes de resistencia funcionales es uno de los principales retos en investigación. Este proyecto tuvo por objetivo identificar homólogos de genes de resistencia (RGH) asociados con resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* agente causal de la antracnosis. Se evaluaron 544 combinaciones de primers degenerados, diseñados a partir de secuencias conservadas en el dominio NBS de genes de resistencia y genes RGH de la especie modelo para leguminosas *Medicago truncatula*. La amplificación, se realizó en ADN total del genotipo Andino G19833, originario de Perú y resistente a antracnosis y mancha angular. Cuatrocientas tres secuencias presentaron los motivos característicos de genes de resistencia tipo NBS, de las cuales 306 presentaron un ORF no interrumpido, por lo que se consideraron como genes RGH. A partir de estas secuencias se realizó el análisis filogenético, teniendo en cuenta un 90% de identidad nucleotídica, esto permitió confirmar la clasificación de los RGHs de frijol, dentro de las familias TIR y no-TIR con valores de bootstrap altos. Las secuencias TIR se agruparon en 3 cluster discriminados en 14 clados y las secuencias no-TIR se agruparon en 3 cluster y 7 clados. Aunque la mayoría de comparaciones pareadas mostró selección purificante aunque algunas secuencias pueden ser el resultado de selección diversificante, lo que muestra la diversidad de RGH en frijol. Los RGHs específicos para frijol, se evaluaron en la librería BAC de G19833. En las secuencias terminales de los clones BAC (BES) positivos se identificaron 629 marcadores SSR y estos se evaluaron en los parentales G2333 (resistente) y G19839 (susceptible). 205 SSR polimórficos fueron evaluados en la población RIL derivada de la cruce entre G2333 x G19839. La evaluación fenotípica para la identificación de QTL se realizó en condiciones de campo e invernadero, donde se evaluaron en total 11 razas. La evaluación genotípica y fenotípica permitió identificar QTL asociados con resistencia a antracnosis, los cuales explicaron varianzas fenotípicas entre 9 y 89%. Estos marcadores constituyen una fuente importante de información, para el desarrollo de marcadores funcionales que puedan ser utilizados en selección asistida o para procesos de clonación posicional de genes de interés.

Palabras clave: RGHs, *Colletotrichum lindemuthianum*, frijol, QTL, librería BAC, G2333, G19839.

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop is constrained by different pathogens which affect its production. Thus, to identify functional resistance genes is one of the main goals in common bean research. One of the first goal to this project was to identify resistance gene homologues (RGH) associated with resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* causal agent of anthracnose. 544 degenerate primers combinations designed from conserved sequences in the NBS domain of resistance genes and RGH genes of the model specie for legumes *Medicago truncatula* were evaluated.

Amplification was carried out on G19833 total DNA this is an Andean genotype, came from Peru and shows resistant to anthracnose and angular leaf spot. Four hundred and three sequences showed the characteristic motifs of NBS type resistance genes, out of which 306 had an uninterrupted ORF, therefore were considered as RGH genes. A phylogenetic analysis was performed from these sequences, taking into account a 90% nucleotide identity, this confirmed the classification of common bean RGHs within TIR and non-TIR families with high bootstrap values. TIR sequences were grouped into 3 clusters discriminated in 14 clades and non-TIR sequences were grouped into 3 cluster and 7 clades. Most of pairwise comparisons showed purifying selection although some sequences may be the result of diversifying selection, which shows the diversity of RGH in beans. Common bean specific RGHs, were evaluated in G19833 BAC library. In BAC-end sequences (BES) of positive clones 629 SSR markers were identified and these were evaluated in the G2333 (resistant) and G19839 (susceptible) genotypes. 205 polymorphic SSR were evaluated in the RIL population derived from G2333 x G19839 cross. The phenotypic evaluation for the identification of QTL was carried out in greenhouse and field conditions, which evaluating 11 races. The genotypic and phenotypic evaluation allowed to identify QTL associated with resistance to anthracnose, with phenotypic variances between 9 and 89%. These markers are an important source of information for the development of functional markers that can be used in assisted selection or positional cloning.

Keywords: RGHs, *Colletotrichum lindemuthianum*, common bean, QTL, BAC library, G2333, G19839.

Contenido

Resumen.....	VIII
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas	XIII
Introducción	1
1. Revision general de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y antracnosis (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)	7
1.1 Generalidades de frijol <i>Phaseolus vulgaris</i>	8
1.2 Antracnosis (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)	9
Fuente: El autor.....	10
1.3 Identificación de razas de <i>C. lindemuthianum</i>	10
1.4 Coevolución en el patosistema <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>C. lindemuthianum</i>	12
1.5 Resistencia a enfermedades.....	14
1.5.1 Genes de resistencia a antracnosis en frijol.....	14
1.5.2 Resistencia en el genotipo G2333	18
1.6 Resistencia a nivel molecular	19
1.6.1 Dominio de unión a nucleótidos (NBS)	20
1.6.2 Dominio con repeticiones ricas en leucina (LRR).....	21
1.7 Homólogos de genes de resistencia: RGHS.	22
1.7.1 Homólogos de genes de resistencia en frijol.....	23
1.8 Mapeo genético y QTL.....	29
1.8.1 Loci de características cuantitativas QTL.....	29
1.8.2 Mapas de ligamiento.....	30
1.8.3 Detección de QTL.....	31
2. Isolation and characterization of NBS genes homologues in common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>, L.)	46
Abstract.....	47
Introduction	48
2.1 Materials and methods	51
2.1.1 Plant materials and DNA extraction	51
2.2 RGH sequences amplification	52
2.3 Cloning and sequencing.....	53
2.4 Phylogenetic analysis.....	54
2.5 Results.....	55
2.5.1 Amplification of common bean RGH sequences	55
2.5.2 Success rate of various primer combinations.....	57
2.5.3 Phylogeny of newly-discovered common bean RGH sequences	58
2.5.4 Ratio of non-synonymous to synonymous nucleotide substitutions.	60
2.5.5 Phylogenetic analysis with other legumes and non-legumes RGH.....	62
2.6 Discussion.....	69
2.7 List of annex.....	75
References.....	83

3. Identification of resistance genes homologues in the G19839 BAC library and mapping of BES-derived microsatellite markers associated with these resistance genes⁸⁹

Abstract.....	90
Introduction	91
3.1 Materials and Methods	95
3.1.1 G19833 BAC library evaluation.....	95
3.1.2 Probe design	96
3.1.3 Filter hibridization.....	96
3.1.4 Identification and evaluation of SSR markers.....	97
3.1.5 SSR amplification	98
3.1.6 Genetic mapping.....	99
3.2 Results.....	99
3.2.1 Detection of RGH-SSR markers in G19833	99
3.2.2 Presence of SSRs within BAC clones containing RGA	102
3.2.3 Evaluation of BMr markers.....	104
3.2.4 Genetic map	106
3.3 Discussion.....	111
3.4 Conclusions	120
References.....	137
4. QTL asociados con la resistencia a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>, en la población G2333 X G19839.....	147
Resumen	148
Introducción	149
4.1 Materiales y métodos	154
4.1.1 Material vegetal y mapa genético	154
4.1.2 Evaluación fenotípica en condiciones de invernadero.....	155
4.1.3 Evaluación fenotípica en condiciones de campo.....	157
4.1.4 Variables evaluadas en campo	158
4.1.5 Análisis de datos e identificación de QTL.....	159
4.2 Resultados.....	161
4.2.1 Evaluación fenotípica en condiciones de invernadero.....	161
4.2.2 Evaluación fenotípica en condiciones de campo.....	166
4.2.3 Identificación de QTL.....	169
4.3 Discusión	183
Conclusiones.....	196
Productos obtenidos.....	¡Error! Marcador no definido.
Bibliografía	197

Lista de figuras

Figura 1- 1. Síntomas de antracnosis en hoja (a), plántula (b) y vaina (c).	10
Figura 1- 2. Fenotipo de semilla en los cultivares diferenciales.	13
Figura 1- 3. Dominios y motivos característicos en genes CC/TIR-NBS-LRR.....	21
Figure 2- 1. Phylogenetic tree of <i>Phaseolus vulgaris</i> RGH sequences constructed with RAxML and using RPS2 from <i>Arabidopsis thaliana</i> to root the tree.	61
Figure 2- 2. Amino acid sequence logos.....	62
Figure 2- 3. Phylogenetic tree to common bean and other legumes and non-legumes RGH non-TIR sequences.	67
Figure 2- 4. Phylogenetic tree to common bean and other legumes and non-legumes RGH TIR sequences.....	68
Figure 3- 1. Positive clones in G19833 BAC library. The names Pv 1-48, 49-96, 97-144 indicate different filters, in which there are the 48 plates of BAC clones that are spotted in a double replicate pattern.	101
Figure 3- 2. Common bean linkage map from 86 recombinant inbreeding lines from G2333 x G19839, with 154 BMr. Primary hits are shown as green colour and secondary hit as red colour.....	109
Figure 3- 3. Pairwise recombination fractions (upper left) and LOD scores (lower right) in G2333 x G19839 genetic map.....	110
Figure 3-4. Comparison of G2333 x G19839 genetics maps obtained with mapmaker/mapdisto versus R-QTL.	111
Figura 4- 1. Fenotipo de semillas de los parentales G23333 y G19839 y de algunas líneas RIL derivadas del cruce entre estos genotipos.	156
Figura 4- 2. Histogramas de la evaluación fenotípica de resistencia/susceptibilidad con nueve razas de <i>C. lindemuthianum</i> en la población RIL G2333 X G19839 en condiciones de invernadero.	165
Figura 4- 3. Síntomas de infección por <i>C. lindemuthianum</i> en hoja y vainas de frijol.....	168
Figura 4- 4. Distribución de los valores fenotípicos en la evaluación de las razas 523 y 525 en condiciones de campo.	169
Figura 4- 5. Matriz genotípica y fenotípica de la población RIL G2333 x G19839... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 4- 6. QTL localizados en los diferentes grupos de ligamiento mediante mapeo por intervalo compuesto.	176
Figura 4- 7. Número de QTL asociados en cada grupo de ligamiento.	177
Figura 4- 8. Interacción entre QTL, al evaluar la raza 525 de <i>C. lindemuthianum</i> , en la población G2333xG19839.....	182

Lista de tablas

Tabla 1- 1. Secuencia de los cultivares diferenciales y códigos binarios	12
Tabla 1- 2. Genes de resistencia a <i>C. lindemuthianum</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i>	15
Tabla 1- 3. Descripción de secuencias reportadas en el Genbank asociadas con homólogos/análogos de genes de resistencia en frijol.....	27
Table 2- 1. Primer combinations used to amplify bean RGHS.....	53
Table 2- 2. Summary of the total common bean RGH and unique sequences with the amount of genes and pseudogenes distinguished among unique sequences.....	57
Table 2- 3. Number of RGH amplified by different types of primer combinations.	58
Table 2- 4. Description of resistance genes from <i>Phaseolus vulgaris</i> included in the phylogenetic analysis, with GenBank nucleotide and protein identities (ID).....	63
Table 3- 1. Number of probes designed for TIR and non-TIR sequences	100
Table 3- 2. Positive bacterial artificial chromosome (BAC) clones and unique positive clones identified by 80 RGH probes in the G19833 library.....	102
Table 3- 3. Number of bacterial artificial chromosoma (BAC) clones from the G19833 library hybridizing with different numbers of probes.	102
Table 3- 4. Comparison of primary and secondary hits identified by Batchprimer3, SSRLocator and AMMD programs.	103
Table 3- 5. Motif types found at BMr loci identified as primary and secondary hits, using Batchprimer3, SSRL and AMMD	104
Table 3- 6. Polymorphism level in the primary and secondary hits evaluated in the genotypes G2333 and G19839.....	105
Table 3- 7. Summary of polymorphism percentage according with the BMr repeat type.	105
Table 3- 8. BMr distribution within the genetic map derived for G2333 x G19839.	108
Tabla 4- 1. Escala de evaluación con su correspondencia en porcentaje de área foliar afectada (AFA) y severidad de 0-100%.	160
Tabla 4- 2. Aislamientos de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Cl) evaluados bajo condiciones de invernadero en los genotipos G19839 y G2333* y la población RILs derivada de la cruce entre estos parentales.	164
Tabla 4- 3. Evaluación de diecisiete aislamientos de <i>C. lindemuthianum</i> en cultivares diferenciales e identificación de razas.	163
Tabla 4- 4. Resumen de evaluación de siete aislamientos de <i>C. lindemuthianum</i> en la población RIL G2333 x G19839 y sus parentales.....	166
Tabla 4- 5. Resumen de los días en los que se realizaron las inoculaciones y/o evaluaciones con la raza 523 en la población RIL G2333 x G19839 en Popayán.	167
Tabla 4- 6. Resumen de los días en los que se realizaron las inoculaciones y/o evaluaciones con la raza 525 en la población RIL G2333 x G19839 en Antioquia.....	168
Tabla 4- 7. QTL identificados con los valores de la escala 1-9 y los valores de la escala 1- 9 transformados, mediante mapeo por intervalo.....	173
Tabla 4- 8. Resumen de los QTL identificados al utilizar los valores de la escala 1-9 y los valores transformados con logaritmo, por medio de CIM.	174
Tabla 4- 9. Resumen de QTL asociados con resistencia a <i>C. lindemuthianum</i> en la población RIL G2333 x G19839, mediante mapeo por intervalo.....	175

Tabla 4- 10. Marcadores asociados a QTL donde se discrimina el grupo de ligamiento, la raza y el tipo de marcador.	179
Tabla 4- 11. Interacciones génicas entre loci en la población G2333 X G19839.....	180

Introducción

El frijol es considerado como una de las leguminosas comestibles más importantes a nivel mundial. Representa la principal fuente de proteína en países subdesarrollados, donde el consumo per capita puede alcanzar los 50 Kg en algunas regiones (Broughton et al., 2003). Para el año 2009, a nivel global se cosechó un área de 25.563.866 ha con una producción de 20.698.984 t, en el que participaron 121 países, aunque el 78% de la producción se da en Asia y América (FAO, 2011). Para este mismo año, en Colombia se sembraron 109.017 ha en frijol, de las cuales se obtuvo una producción de 106.266 t, lo que corresponde a tan solo el 0.78% de la producción mundial (FAO, 2011).

A pesar de que Colombia cuenta con todas las condiciones para el cultivo de frijol, la siembra de esta leguminosa considerada importante en la seguridad alimentaria se ha desestimulado, lo que conlleva a que actualmente la producción nacional no sea suficiente para cubrir la demanda interna y se tengan que realizar importaciones (Fenalce, 2010). Dentro de las razones que explican la falta de motivación para la siembra de esta leguminosa, se encuentra la presencia de enfermedades como la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib., que puede incluso llegar a causar la pérdida total del cultivo (Guzmán et al., 1979).

Para su control los agricultores utilizan una gran cantidad de agroquímicos, lo que incrementa los costos de producción y por lo tanto genera baja rentabilidad, también incrementa el impacto ambiental desfavorable por contaminación de suelo y agua y puede causar toxicidad al personal que hace las aplicaciones de manera frecuente y utilizando una alta concentración de los fungicidas. En Colombia las pérdidas en producción pueden llegar a ser del 95% cuando se siembran variedades susceptibles y las medidas de control son inadecuadas (Guzmán et al., 1979a). Por lo tanto para el control de esta enfermedad, la resistencia genética es la estrategia de manejo más eficiente, práctica y económica, además de ser fácilmente adoptada por los agricultores (Silva and Santos, 2001).

Los estudios para establecer cómo está gobernada la resistencia genética iniciaron hace casi un siglo cuando Barrus, (1915) describió el primer gen de resistencia a antracnosis en frijol. Actualmente se han reportado trece genes cualitativos (doce genes dominantes *Co-1-Co-13* y un gen recesivo *co-8*) que controlan la resistencia a *C. lindemuthianum*, siguiendo el modelo de interacción gen a gen y adicionalmente han sido asignados algunos QTL (Quantitative Trait Loci), que confieren resistencia de tipo cuantitativo (Geffroy et al., 1998; Creusot et al., 1999; Rivkin et al., 1999; López et al., 2003; Kelly and Vallejo, 2004). La piramidación (introducción de 2 o más genes de interés en un solo cultivar), de algunos de estos genes permitiría obtener un espectro de resistencia duradero, útil para el manejo de *C. lindemuthianum* que presenta una alta variabilidad (Balardin et al., 1997; Young et al., 1998; Kelly and Vallejo, 2004).

En los programas de mejoramiento con métodos de selección convencional, la identificación de genotipos resistentes, presenta algunas limitaciones como el enmascaramiento de genes de interés por relaciones epistáticas, la penetrancia incompleta de la resistencia, la variabilidad en agresividad o poca disponibilidad del patógeno y la sensibilidad diferencial de la reacción a la enfermedad por las condiciones ambientales. En consecuencia la selección de materiales resistentes, puede ser poco confiable y puede resultar un proceso largo, difícil y costoso (Michelmore, 1995; Winter and Kahl, 1995; Young and Kelly, 1996). Por estas razones la Selección Asistida por Marcadores (SAM), que se basa en la identificación de marcadores asociados con los genes de resistencia, permite complementar el mejoramiento convencional y reducir el tiempo en la obtención de variedades mejoradas (Young and Kelly, 1996; Kelly and Melotto, 1999; Awale and Kelly, 2001; Silva and Santos, 2001).

En el proyecto de Horticultura de la Universidad Nacional, sede Bogotá, en el 2002 se inició un programa de mejoramiento dirigido a la obtención de nuevas variedades de frijol común con atributos de rendimiento y potencial para nuevos mercados. Como fuente de resistencia a antracnosis se utilizó el genotipo de frijol Mesoamericano G2333, el cual presenta un amplio espectro de resistencia, siendo resistente a todas las razas de *C. lindemuthianum* identificadas en Colombia. La resistencia en G2333 se da por la presencia de los genes *Co-7*, *Co-5* y *Co-4²* y un cuarto gen que aun no se ha caracterizado (Pastor-Corrales et al., 1994; Young et al., 1998; Kelly and Vallejo, 2004; Vallejo and Kelly, 2009).

El cruzamiento entre variedades cultivadas en Boyacá y Cundinamarca como el frijol Bola Roja y Cargamanto y G2333, permitió la obtención de poblaciones y líneas avanzadas con resistencia a antracnosis y con características de grano comercial. Dentro de la ejecución del proyecto, se utilizaron técnicas de mejoramiento convencional, como identificación de genotipos de interés, procesos de hibridación y selección. Así mismo, se implementó el uso de selección asistida con marcadores moleculares (SAM), específicamente mediante el uso del marcador molecular SCAR (sequence characterized amplified regions) SAB3 ligado al gen de resistencia *Co-5* y el SAS13 que hace parte del gen *Co-4*² (Young et al., 1998; Kelly et al., 2003). Como resultado, actualmente se cuenta con poblaciones avanzadas y variedades en las que se logró obtener las características de grano comerciales y se introdujo la resistencia conferida por G2333. De esta manera se utilizó SAM para complementar y acelerar el proceso de mejoramiento, sin embargo, se evidenció la necesidad de identificar nuevos marcadores, más ligados a los genes de interés, puesto que SAB3 se encuentra a una distancia de 12.98 Cam del gen *Co-5* y aunque se reportó que SAS13 hace parte del gen *Co-4*² (Melotto and Kelly, 2001), se presentan algunos recombinantes.

Para la identificación de marcadores moleculares eficientes en la selección de genotipos con las características de interés, se ha desarrollado la técnica conocida como: homólogos de genes de resistencia (RGH) (Cannon et al., 2002), análogos de genes de resistencia (RGA) (Leister et al., 1996) o genes de resistencia candidatos (RGC) (Zhang et al., 2011). Esta metodología se basa en que la mayoría de los genes de resistencia, codifican proteínas con dominios altamente conservados. A partir de las secuencias conservadas se diseñan primers degenerados, los cuales son amplificados en la especie de interés, y si se presenta un amplicón con el tamaño indicado puede tratarse de un homólogo de un gen de resistencia (Michelmore, 2000).

Se han identificado RGHs que co-localizan con loci que codifican para genes de resistencia mayores y loci de características cuantitativas (QTL) (Pflieger et al., 2001; Lanaud et al., 2004). Por esta razón la identificación de RGHs representa una estrategia útil para la amplificación de secuencias candidatas a genes de resistencia. Estas secuencias pueden ser desarrolladas en marcadores moleculares para su uso en SAM, mapeo genético o clonación posicional de nuevos genes *R* (Michelmore, 2000; Spielmeier et al., 2000; Totad et al., 2005; Mutlu et al., 2006; Pei et al., 2007).

En frijol se han desarrollado varias investigaciones que involucran búsqueda de RGAs y se han obtenido muy buenos resultados, con la identificación de RGAs asociados a genes mayores y QTL (Geffroy et al., 1999; López et al., 2003; Mutlu et al., 2006).

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo general realizar el primer estudio detallado de homólogos de genes de resistencia en frijol, utilizando inicialmente el genotipo G19833 y validando los RGH identificados en la población G2333 x G19839. Se seleccionó esta población principalmente por las siguientes razones: el 70% del área cultivada en Colombia corresponde a frijol voluble, tanto G2333 como G19839 tienen hábito de crecimiento indeterminado, lo que hace a esta población de interés para programas de mejoramiento en frijol voluble; G2333 presenta los genes de resistencia que están siendo utilizados en el programa de mejoramiento de frijol Andino para resistencia a antracnosis; se requiere saturar el grupo de ligamiento b07 donde se encuentra el gen *Co-5* y de esta manera identificar marcadores más ligados al gen *Co-5* y en condiciones de campo se ha observado cierto nivel de resistencia en G19839.

Para la identificación de los RGH en frijol se evaluó un gran número de primers degenerados, diseñados a partir de genes de resistencia y RGH descritos en *Medicago truncatula*. Las secuencias identificadas como RGH se agruparon teniendo en cuenta un 90% de identidad nucleotídica. De cada uno de los clados obtenidos se seleccionó una secuencia representativa, la cual se utilizó para realizar el análisis filogenético y el diseño de sondas, las cuales fueron evaluadas en la librería BAC del genotipo G19833. En las secuencias terminales (BAC-end sequence o BES) de los clones positivos se identificaron marcadores microsatélites, los cuales se denominaron RGH-SSR o BMr (Bean Microsatellite associated to resistance). Para determinar el polimorfismo, estos marcadores RGH-SSR se evaluaron inicialmente en los genotipos G2333 y G19839 y los marcadores polimórficos se evaluaron en la población RIL obtenida de la cruce G2333 x G19839. La identificación de loci de resistencia cuantitativa (QTL por sus siglas en inglés Quantitative trait loci), se realizó teniendo en cuenta la matriz de genotipificación obtenida para la población G2333 x G19839 y pruebas de

patogenicidad mediante infecciones con once aislamientos de *C. lindemuthianum* en condiciones de campo e invernadero.

Estos resultados correspondieron a tres objetivos específicos, los cuales se presentan en forma de artículo en tres capítulos diferentes. Adicionalmente se presenta un capítulo inicial, donde se revisan los conceptos más importantes para el desarrollo del presente trabajo. De esta manera el documento se presenta de la siguiente forma:

En el capítulo 1: **“Revisión general de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y antracnosis (*C. lindemuthianum*)”**, se presenta una revisión general de los aspectos más importantes involucrados en el desarrollo del trabajo como: descripción de *Phaseolus vulgaris*, *C. lindemuthianum*, resistencia, genes de resistencia a antracnosis en frijol, marcadores moleculares y mapeo de QTL.

El capítulo 2: **“Isolation and characterization of NBS resistance genes homologues in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)”**, presenta la identificación de homólogos de genes de resistencia en frijol, mediante la evaluación de primers degenerados, diseñados a partir de la región NBS de genes *R* y RGHS de *Medicago truncatula* y las relaciones filogenéticas de las secuencias RGHS de frijol obtenidas.

En el capítulo 3: **“Identification of resistance gene homologues in the G19839 BAC library and mapping of BES-derived microsatellite markers associated with these resistance genes”**, se desarrolla la identificación de marcadores microsatélite o SSR, asociados a secuencias terminales de clones BAC en la librería del genotipo de frijol Andino G19833 y la saturación del mapa G2333xG19839 utilizando los marcadores RGH-SSR o BMr.

Finalmente, en el capítulo 4: **“QTL asociados con la resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*, en la población G2333 x G19839”**, se describe la identificación de QTL ligados con resistencia a antracnosis, utilizando las evaluaciones fenotípicas de resistencia/susceptibilidad de la población RIL G2333 x G19839 en condiciones de campo e invernadero con diferentes razas de *C. lindemuthianum*.

1.Revision general de fríjol (*Phaseolus vulgaris*) y antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*)



1.1 Generalidades de frijol *Phaseolus vulgaris*

El frijol dentro de las leguminosas de grano, es considerada la especie más importante para el consumo humano. Su producción abarca áreas diversas, por lo que se puede decir que prácticamente se cultiva en todo el mundo (Broughton et al., 2003).

La familia Leguminosae (Fabaceae) contiene cerca 643 géneros que incluyen 18.000 especies distribuidas en tres grandes subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae, y Papilionoideae (o Faboideae) (Gepts et al., 2008). El género *Phaseolus* es miembro de la tribu Phaseoleae, la cual incluye leguminosas de clima tropical como caupi, gandul y soya. Esta tribu hace parte del clado Millettioide el cual divergió hace 45-50 millones de años del clado Hologalegina, que contiene la mayoría de las leguminosas de clima templado como son arveja, alfalfa, *Medicago truncatula*, garbanzo y lenteja (Broughton et al., 2003)

Phaseolus es un género diploide, en el que la mayoría de las especies tienen un número $2n=2x=22$ cromosomas (algunas especies tienen $2n=2x=20$). Debido a la importancia de las leguminosas, se han realizado proyectos de secuenciación de genoma en especies modelo como *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*. En frijol la secuenciación del genoma está en curso y se ha propuesto como un modelo, debido a que su genoma es considerado pequeño dentro de las especies cultivadas con importancia económica (comparable al del arroz, 490 Mbp/genoma haploide) (Bennett and Leitch 2005). En una publicación preliminar, una versión inicial del genoma de frijol (genotipo G19833) reporta un ensamble de aproximadamente 486.9 Mb agrupadas en 10.132 scaffolds, y 430.4 Mb agrupados en 46.828 contigs (~11.6 % gap). 1.601 scaffolds tiene >50 Kb en tamaño, lo que representa aproximadamente el 87.4% del genoma (<http://www.phytozome.net/commonbean.php>). Las secuencias fueron generadas principalmente con la plataforma Roche 454 e incluye un cubrimiento de 19.5x, y se ensambló con Newbler 2.6. Adicionalmente, lectura de secuencias terminales de clones BAC (BAC-end sequences o BES) y secuenciación por Sanger, se está utilizando para complementar el ensamblaje de las secuencias.

En frijol se cuenta con una amplia base genética, la cual se encuentra salvaguardada en diferentes bancos de germoplasma, donde se destaca el del CIAT, que cuenta con más de 36.000 accesiones, que incluyen tanto especies silvestres, como accesiones de las cinco especies domesticadas: *Phaseolus vulgaris*: frijol común; *P. coccineus*: ayocote; *P. dumosus*: frijol de año; *P. acutifolius*: frijol tepari y *P. lunatus*: frijol lima. Adicionalmente se encuentran tres colecciones grandes, en el departamento de agricultura de Estados Unidos, en Pullman, Washigton, en el Instituto Leibniz de Investigación Genética de Plantas y Cultivos (IPK) en Gatersleben -Alemania y en el Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnología (CENARGEN/ EMBRAPA) en Brasilia.

Basados en características morfológicas (Delgado-Salinas et al., 1988), tipos electroforéticos de faseolina (Gepts, 1988; Kami et al., 1995), isoenzimas (Singh et al., 1991; Debouck et al., 1993) y RFLPs (Becerra Velásquez and Gepts, 1994) Se han identificado tres áreas de diversidad para poblaciones naturales de frijol: el centro Mesoamericano, sur-andino y norte-andino. Los análisis genéticos basados en marcadores neutrales dan evidencia de dos procesos de domesticación independientes en los centros de diversidad sur-andino y Mesoamericano, conduciendo al desarrollo del acervo genético Andino y Mesoamericano, respectivamente (Gepts and Debouck, 1991; Gepts, 1998).

1.2 Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*)

Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magnus) Lams. –Scrib. (Telomorfo: *Glomerella cingulata* f.s. *phaseoli*, *G. lindemuthiana*) es un hongo Deuteromycete, haploide y uninucleado (Bryson et al., 1992).

Los síntomas principales de esta enfermedad sobre plantas de frijol son manchas de color café oscuro en el envés de las hojas y cuando la infección es más fuerte llega a afectar las nervaduras y el tallo, en este último caso las manchas son más hundidas. En las vainas produce manchas circulares y hundidas de color café, las cuales llegan posteriormente a infectar el grano y de esta manera pierde la calidad comercial (Schwartz et al., 2005).

En una variedad susceptible, la planta puede ser atacada desde la siembra hasta la cosecha. Cuando la enfermedad proviene de semilla infectada portadora del inóculo primario, bajo condiciones favorables al hongo, no hacer ningún tipo de control puede representar pérdidas de hasta el 100% de la cosecha (Guzmán et al., 1979a).

Figura 1- 1. Síntomas de antracnosis en hoja (a), plántula (b) y vaina (c).



Fuente: El autor

1.3 Identificación de razas de *C. lindemuthianum*

Existen muchas razas del hongo que difieren en su patogenicidad, es decir en la capacidad de producir la enfermedad según el cultivar, y en su virulencia, es decir en el grado de agresividad. Se han efectuado numerosos reconocimientos en diferentes partes del mundo para determinar la prevalencia y distribución de las razas (Balardin et al., 1997; Melotto et al., 2000; Riascos, 2001).

A pesar del esfuerzo por describir las razas de una manera equivalente en diferentes países, los datos colectados usando hospederos locales limitaron el conocimiento de la variabilidad presente en *C. lindemuthianum* alrededor del mundo (Pastor-Corrales, 1988). Por esta razón, en 1988 se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), el “Primer taller de antracnosis de frijol en América Latina” donde se estableció una serie diferencial de 12 cultivos de frijol de diverso origen y un sistema binario basado en la posición de cada cultivar en esta serie, de esta manera se buscó entender mejor la variabilidad y estructura de las poblaciones de *C. lindemuthianum*. Con esto se logró uniformizar la designación de las razas, y coordinar todos los esfuerzos para facilitar el intercambio de resultados y de germoplasma resistente.

La clasificación de una raza se da por la suma de los valores numéricos de cada cultivar diferencial susceptible para esa raza (Tabla 1-1, Figura 1-2). La adopción de este procedimiento ha permitido la comparación y compilación de datos de diferentes grupos y una completa caracterización de la alta variabilidad de *C. lindemuthianum* (Melotto et al., 2000; Kelly and Vallejo, 2004), donde hasta el momento se han identificado más de 100 razas diferentes alrededor del mundo (González-Chavira et al., 2004). En Colombia en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Santander, Antioquia, Cauca y Valle se evaluaron 127 aislamientos monospóricos de *C. lindemuthianum* y se determinaron 35 razas, de las cuales la raza 3 fue la que se presentó con mayor frecuencia en todos los departamentos (Rincon, 2007).

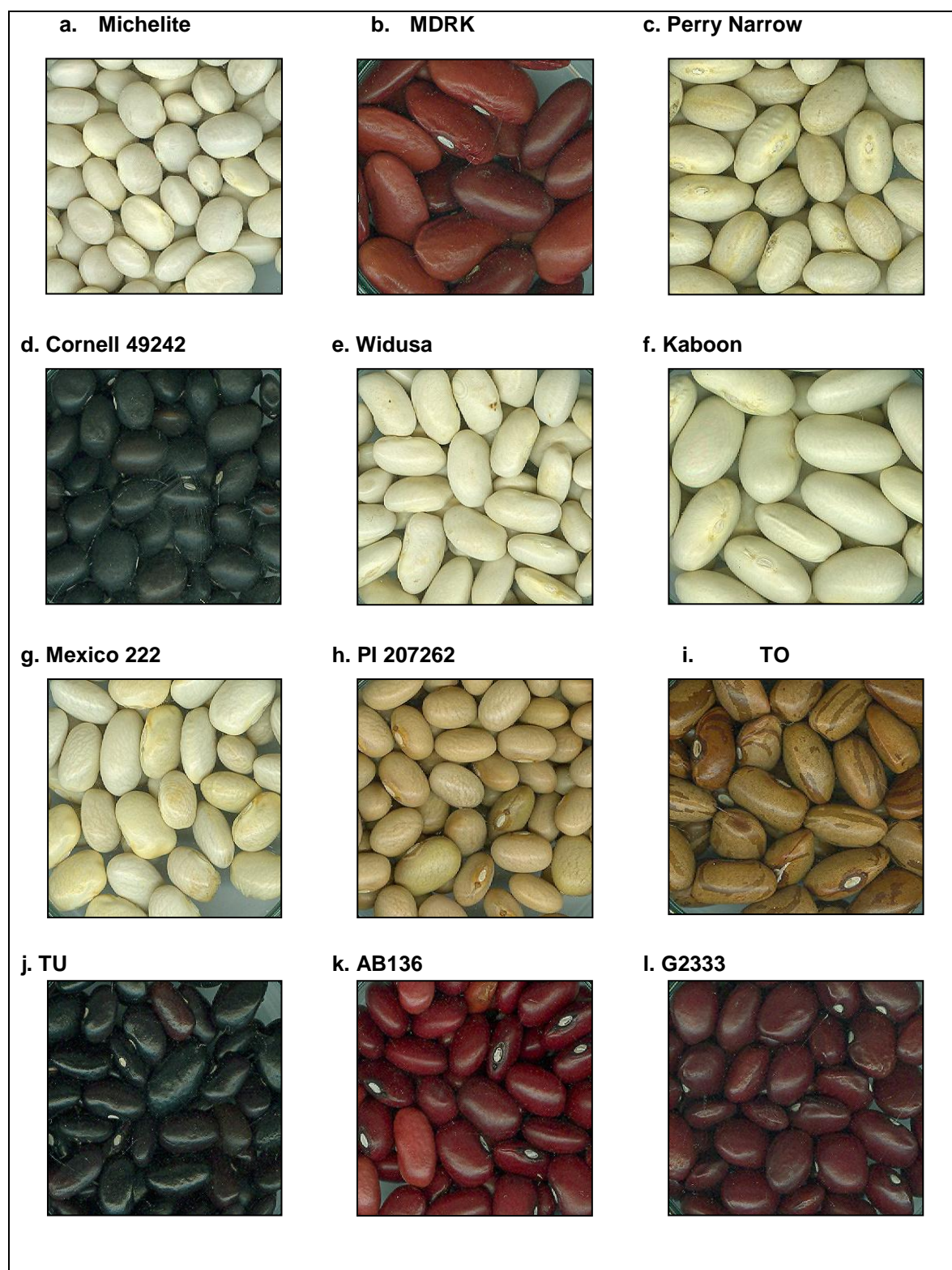
Tabla 1- 1. Secuencia de los cultivares diferenciales y códigos binarios

Cultivar Diferencial	Genes de resistencia ^I	Acervo genético ^{II}	Número Binario ^{III}
a. Michelite	Co-11	MA	1
b. MDRK	Co-1-Co-3	A	2
c. Perry Marrow	Co-13 , Co-1 ³	A	4
d. Cornell 49242	Co-2	MA	8
e. Widusa	Co-1 ⁵ -Co-3,	A	16
f. Kaboon	Co-1 ²	A	32
g. Mexico 222	Co-3	MA	64
h. PI 207262	Co-4 ³ , Co-3 ³	MA	128
i. TO	Co-4	MA	256
j. TU	Co-5	MA	512
k. AB136	Co-6, co-8	MA	1024
l. G2333	Co-4 ² , Co-5 ² , Co-7	MA	2048

^I Genes de resistencia en el hospedero. ^{II} MA Mesoamericano; A Andino. ^{III} Número binario. 2ⁿ, n es el lugar del cultivar en la serie. La suma de los cultivares con reacción susceptible da el número de una raza específica. Ejemplo: raza 17= patogénica sobre Michelite (1) y Widusa (16).

1.4 Coevolución en el patosistema *Phaseolus vulgaris*-*C. lindemuthianum*

Inoculaciones cruzadas entre *P. vulgaris* y *C. lindemuthianum* han revelado un proceso de coevolución (Geffroy et al., 1999). Esto significa que el patógeno ha evolucionado paralelamente a su hospedero, por lo que se ha generado una población del hongo especializada y adaptada a los acervos de frijol (Geffroy et al., 1999; Melotto et al., 2000; Araya, 2003). Gepts (1988), fue el primer investigador que determinó la existencia de coevolución de los caracteres de virulencia de *C. lindemuthianum* con los acervos genéticos de frijol. Esto fue confirmado por Balardin and Kelly (1998), al determinar que las razas de *C. lindemuthianum* de origen Andino eran patogénicas solamente en el acervo Andino, mientras que las mesoamericanas eran patogénicas en ambos acervos genéticos de frijol.

Figura 1- 2. Fenotipo de semilla en los cultivares diferenciales.

Finalmente, Chiorato et al. (2006), evaluaron la reacción de 120 accesiones Mesoamericanas, 57 Andinas, y 43 cultivares mejorados, del Banco de germoplasma de frijol del Instituto Agronômico de Campinas (Brasil), al ser inoculadas con las razas 31, 65 y 89 de origen mesoamericano, encontrando que la mayoría de genotipos resistentes eran los cultivares Andinos y los mejorados.

Estos resultados muestran la asociación entre el origen de *Phaseolus vulgaris* y *C. lindemuthianum*, aumentando el conocimiento a nivel biológico de las reacciones de defensa a la infección con este patógeno y orientando la selección de parentales para ser usados en programas de mejoramiento por hibridación (Chiorato et al., 2006). La división del frijol en acervos genéticos y la coevolución con *C. lindemuthianum*, sugiere la posibilidad de una estrategia de control basada en esta división. Si los patógenos están especializados, la transferencia de genes entre acervos puede proporcionar un tipo de resistencia durable. Así mismo la piramidación de genes de resistencia de diferentes acervos genéticos puede dar resistencia más durable a la antracnosis (Balardin et al., 1997; Young et al., 1998).

1.5 Resistencia a enfermedades

1.5.1 Genes de resistencia a antracnosis en frijol

La resistencia a antracnosis en frijol está condicionada principalmente por trece genes mayores independientes, identificados con el símbolo *Co*, seguido por un número. Con excepción del *co-8*, todos son genes dominantes y en algunos de ellos como *Co-1*, *Co-3/Co-9/Co-7*, *Co-4* y *Co-5* se han descrito múltiples alelos (Kelly and Vallejo, 2004; Kelly, 2010). La Tabla 1-2 presenta los genes *Co* identificados hasta el momento, las diferentes formas alélicas y se discrimina a que acervo genético está asociado y el grupo de ligamiento donde se ha mapeado.

Tabla 1- 2. Genes de resistencia a *C. lindemuthianum* en *Phaseolus vulgaris*

Gen	Acervo genético	Grupo de ligamiento
Co-1 ¹ , Co-1 ² , Co-1 ³ , Co-1 ⁴ , Co-1 ⁵	Andino	b01
Co-2	Andino	b11
Co-3, Co-3 ² , Co-3 ³	Mesoamericano	b04
Co-4, Co-4 ² , Co-4 ³	Mesoamericano	b08
Co-5, Co-5 ²	Mesoamericano	b07
Co-6	Mesoamericano	b07
Co-7	Mesoamericano	NA
Co-8	Mesoamericano	NA
Co-9	Mesoamericano	b04
Co-10	Mesoamericano	b04
Co-11	Mesoamericano	NA
Co-12	Andino	NA
Co-13	Andino	b03

El gen Co-1 fue descrito originalmente como el gen A por Barrus (1915), quien lo identificó en el cultivar “Well’s Red Kidney”. Entre todos los loci caracterizados, este es uno de los pocos originario del acervo Andino y fue el primer gen mayor utilizado para desarrollar cultivos de frijol resistentes a antracnosis, específicamente frente a las razas α y β descritas por Barrus (1911). Los cultivares diferenciales MDRK, Perry Marrow y Kaboon y Widusa portan diferentes alelos de este gen. El gen Co-1 tiene gran valor en programas de mejoramiento de frijol mesoamericano y se ha observado que el alelo Co-1² confiere el espectro de resistencia más amplio (Kelly and Vallejo, 2004).

Mastenbroek (1960), describió el gen Mesoamericano Co-2, en la variedad de frijol venezolano Cornell 49242, que confiere resistencia frente a la raza δ . Este gen fue la primera fuente de resistencia usada en todo el mundo, sin embargo, la aparición de las razas 31, 63 y 89 patogénicas sobre éste, enfatizaron la necesidad de utilizar nuevos materiales. Hasta el momento no se han reportado alelos múltiples en el locus Co-2. Actualmente tiene poco valor en programas de mejoramiento, debido a la aparición de múltiples razas patogénicas en los cultivares que presentan éste gen (Melotto et al., 2000; Kelly and Vallejo, 2004).

El gen *Co-3*, se conoció originalmente como *México 1* y fue descrito en el cultivar México 222 por Bannerot (1965). El uso de este gen en mejoramiento está limitado a ciertas regiones, por ejemplo se ha observado que confiere resistencia a las razas 3481, 3977 y 3993 de Costa Rica, pero en países como Brasil no tiene importancia, debido a la presencia de otras razas patogénicas (Kelly and Vallejo, 2004). Méndez-Vigo et al. (2005) localizaron este gen al final del grupo de ligamiento b04. En el genotipo Mexico 227 se identificó un segundo alelo denominado *Co-3*² (Bañero, 1965; Fouilloux, 1979). Los genes *Co-7* y *Co-9* (codificado actualmente como *Co-3*³), corresponden a alelos del gen *Co-3* (Rodríguez-Suárez et al., 2008; Singh and Schwartz, 2010). Young et al. (1998), describieron el gen *Co-7* como el tercero presente en el cultivar G2333. Su valor en mejoramiento no ha sido determinado, por lo que no es recomendado para ser utilizado en programas de mejoramiento hasta que no se cuente con información acerca de su patrón de resistencia (Kelly and Vallejo, 2004). Geffroy et al. (1999), describieron el gen *Co-9*, presente en el genotipo BAT93 derivado del cultivar diferencial PI 207262, se ha reportado que brinda un amplio espectro de resistencia. Entre las múltiples formas alélicas, se encuentra *Co-9*³, presente en el cultivar Widusa (Kelly and Vallejo, 2004).

El gen *Co-4* originalmente se denominó *Mexico 2* y fue descrito en el cultivar TO por Fouilloux (1979). Young et al. (1998) establecieron que el locus *Co-4* es complejo y representa una serie multialélica. En el genotipo SEL1308, derivado del cultivar diferencial G2333 se reportó el alelo *Co-4*², actualmente es reconocido como uno de los principales genes de resistencia frente a antracnosis. Alzate-Marin et al. (2007), confirmaron la presencia de un tercer alelo en el cultivar diferencial PI207262 y propusieron que fuera denominado *Co-4*³. Finalmente por estudios preliminares realizados con el cultivar G2338 se piensa en la presencia de otro alelo en el locus *Co-4* (Kelly and Vallejo, 2004). La resistencia conferida por *Co-4* ha demostrado ser efectiva contra un gran número de aislamientos de *C. lindemuthianum* y es una fuente de resistencia importante usada en diferentes programas de mejoramiento (Alzate-Marín et al., 2004; Kelly and Vallejo, 2004).

Bannerot (1969), citado por Fouilloux (1979), describió el gen *Co-5* presente en el cultivar TU, originalmente conocido como *Mexico 3*. El alelo presente en TU tiene un espectro de resistencia más amplio, puesto que confiere resistencia frente a las razas 3481 y 3545 a las cuales el gen *Co-5* presente en G2333 no ofrece resistencia. Por esta razón

Vallejo and Kelly (2009), propusieron denominar *Co-5²* al alelo presente en SEL 1360 (proveniente de G2333). Este gen no ha sido usado ampliamente en programas de mejoramiento, aunque se cuenta como uno de los genes más efectivos frente a razas de *C. lindemuthianum* de Centroamérica y México. El gen *Co-5* tiene gran valor en programas de mejoramiento interesados en piramidar genes de resistencia independientes (Kelly and Vallejo, 2004; Campa et al., 2005).

Schwartz et al. (1982), reportaron el gen *Co-6*, presente en el cultivar AB136; éste ofrece amplia resistencia a un gran número de razas de *C. lindemuthianum*, particularmente aquellas de origen Andino, aunque necesita ser piramidado con otros para extender su valor en regiones donde aún no ha sido utilizado. Hasta el momento no se han reportado alelos múltiples (Kelly and Vallejo, 2004).

El gen recesivo *co-8*, fue descrito en el cultivar AB136 (Alzate-Marin et al., 1997), en este gen tampoco se han reportado alelos múltiples. Debido a la falta de estudios que determinen su espectro de resistencia, o de estudios genéticos para soportar su independencia el uso de este gen en mejoramiento resultaría inadecuado (Kelly and Vallejo, 2004).

El gen *Co-10*, fue descrito en el cultivar Ouro negro de Brasil donde ofrece resistencia a las razas de *C. lindemuthianum* más comunes en este país; sin embargo, aun se desconoce su valor en otras zonas. Hasta el momento no se han reportado formas alélicas (Alzate-Marin et al., 2001; Kelly and Vallejo, 2004).

El gen *Co-11*, se identificó en el cultivar diferencial Michelite, (Goncalves-Vidigal et al., 2005). El gen *Co-12* se identificó en la línea mejorada Jalo Vermelho, aunque fue descrito hace poco lo reportan como una fuente de resistencia útil para programas de mejoramiento (Goncalves-Vidigal et al., 2008). Finalmente, el gene *Co-13* fue identificado en el genotipo mejorado “Jalo Listras Petras” de origen Andino (Gonçalves-Vidigal et al., 2009).

Debido a que cada uno de estos genes confiere resistencia de manera específica a ciertas razas del patógeno, se ha sugerido que la resistencia a antracnosis en frijol común

sigue el modelo gen por gen (Flor, 1971; Melotto and Kelly, 2001), aunque la ausencia del ciclo sexual en el hongo no ha permitido la caracterización de genes de avirulencia (Creusot et al., 1999) que permitan confirmarlo.

1.5.2 Resistencia en el genotipo G2333

G2333 es el cultivar diferencial con el mayor espectro de resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*, conferido por tres genes de resistencia dominantes e independientes (*Co-4*², *Co-5*² y *Co-7*) (Pastor-Corrales et al., 1994; Young and Kelly, 1996; Vallejo and Kelly, 2009).

Pastor-Corrales et al. (1994), lograron determinar que la resistencia en G2333 era controlada por dos genes dominantes independientes denominados *Co-4* y *Co-7*. Balardin et al. (1997), describieron uno de estos genes como *Co-4*², diferenciándolo del alelo presente en el cultivar TO, debido a su amplio espectro de resistencia, que le brindaba al frijol incompatibilidad en la interacción con 33 de las 34 razas de *C. lindemuthianum* colectadas en diferentes países de América Latina. Posteriormente, Young and Kelly (1996), mostraron que este cultivar también porta el gen *Co-5*, el cual no fue observado por Pastor-Corrales et al., porque utilizaron la raza 521, patogénica frente a este gen.

Vallejo y Kelly (2009), propusieron denominar *Co-5*² al alelo proveniente de G2333 puesto que el espectro de resistencia es diferente al identificado en TU, el cual está dado por el gen *Co-5*. Mediante pruebas de alelismo Vallejo and Kelly (2009), determinaron que G2333 posee un cuarto gen, aunque no se han realizado estudios adicionales que reporten más información acerca de este nuevo gen.

G2333 ha mostrado ser resistente en evaluaciones de campo con una gran presión del patógeno, en países como Argentina, Brasil, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, México y África. A causa de su amplia resistencia fue liberado como cultivar comercial en Rwanda, donde se conoce como Umubano. También es sembrado en áreas cercanas en Burundi, el Kivu (región de Zaire) y algunas partes de Uganda (Pastor-Corrales et al., 1994).

Dentro de los trabajos donde se ha determinado el gran espectro de resistencia, se encuentra el realizado por Pastor-Corrales et al. (1994), donde se estudió la reacción de G2333 a 380 aislamientos, 108 provenientes de Colombia y los restantes de otros 10 países Latinoamericanos. Los autores observaron una resistencia amplia, ya que no presentó reacción de compatibilidad con ninguno de los aislamientos, tanto en condiciones de invernadero como en campo, por lo que probablemente los mismos genes controlan la resistencia en ambas etapas de desarrollo de la planta. Según Mahuku et al., (2002), el cultivar G2333 es resistente a más del 90% de las razas que han sido descritas, aunque es susceptible a las razas 3481, 3545, 3977 y 3933 de Costa Rica, México y Argentina. Adicionalmente, Riascos (2001) encontró que de 90 razas provenientes de 200 aislamientos de todo el mundo, este cultivar solo fue compatible con las razas 3481, 3545, 3877 y 3993.

1.6 Resistencia a nivel molecular

La resistencia ha sido clasificada de diferentes formas, sin embargo una clasificación ampliamente aceptada constituye defensa basal y la resistencia fundamentada en genes *R*. En la defensa basal, la planta puede reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, conocidos también como MAMPs por patrones moleculares asociados a microbios), por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PPRs) (Dangl and Jones, 2001). Algunos PPRs han sido identificados en plantas, como por el ejemplo el FLS2 que es un receptor kinasa con repeticiones ricas en leucina, localizado en la membrana plasmática y que reconoce el péptido flg22 presente en la flagelina de bacterias (revisado en Bent and Mackey, 2007). Una vez la respuesta basal ha sido superada por el patógeno, la resistencia se da por el reconocimiento de un efector codificado por el patógeno, el cual es reconocido por un gen de resistencia (*R*) en la planta. Cuando la interacción se da el efector es considerado un factor de avirulencia, por lo que esta respuesta se conoce como inmunidad activada por efectores (ETI) (Dangl and Jones, 2001), que corresponde al modelo gen por gen propuesto por Flor (1971).

Aunque el modelo gen a gen, ha explicado la interacción en algunos patosistemas como por ejemplo en *Oryza sativa* - *Magnaporthe oryzae* (PITA- AvrPITA) y *Linum*

usitatissimum - *Melampsora lini* (L-AvrL567); en otros no se ha podido comprobar la interacción directa entre la proteína de resistencia y la de avirulencia. Por lo tanto, se ha propuesto que en el reconocimiento del patógeno está involucrada una tercera proteína, que actúa como guardiana por lo que se ha denominado modelo del gen guarda. En este modelo el efector es reconocido por la proteína blanco de patogenicidad, que presenta un cambio conformacional o estructural (p.ej., fosforilación), el cual es reconocido por la proteína de resistencia (guarda, vigila a la proteína blanco de patogenicidad) y de esta manera se activa la cascada de señalización que conduce a la resistencia (Jones y Dangl, 2006).

Un nuevo modelo ha sido propuesto para explicar la percepción indirecta de los efectores del patógeno por parte de la planta y se ha denominado “modelo decoy” (van der Hoorn and Kamoun, 2008). Este modelo implica que algunos blancos en el hospedero han evolucionado y actúan como un señuelo para atrapar el patógeno en un evento de reconocimiento que conduzca a la resistencia. De esta manera el modelo decoy involucra 4 componentes: la proteína R, el señuelo, un blanco operativo en la planta y un efector en el patógeno (ibid).

El desarrollo de diferentes técnicas en biología molecular, ha permitido la clonación de genes *R*, que confieren resistencia de tipo cualitativo en diferentes especies vegetales. Las proteínas codificadas por estos genes se han agrupado de acuerdo a la presencia de algunos dominios característicos, como por ejemplo el dominio de unión a nucleótidos (NBS), repeticiones ricas en leucina (LRR) y quinasa. La clase más común corresponde a genes que codifican dominios tipos NBS-LRR, los cuales se han subdividido en la clase TIR (*toll and interleukin-1 receptor*) y no TIR, basados en la presencia o ausencia de un dominio TIR en el N terminal de la proteína. La mayoría de los genes *R* no-TIR codifican un dominio CC *coiled coil* o cremallera de leucina.

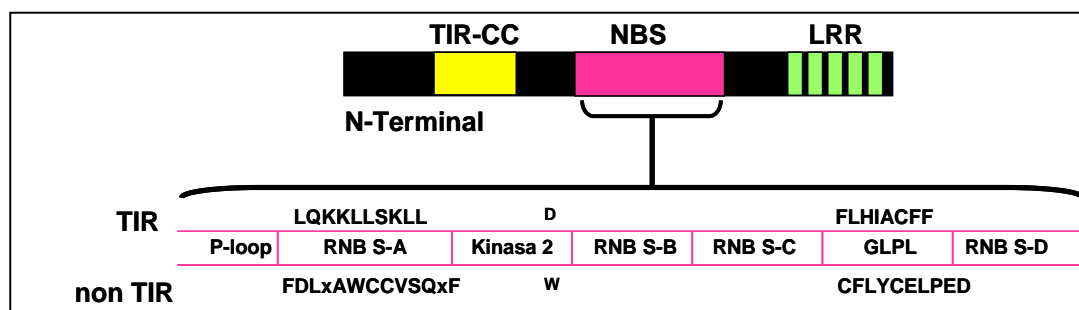
1.6.1 Dominio de unión a nucleótidos (NBS)

Los genes que codifican una secuencia NBS son comunes en el genoma de las plantas. Los sitios de unión a nucleótidos (NBS), son dominios característicos de muchos productos de genes de resistencia, esenciales para la actividad catalítica en procarióticas

y eucarióticas, puesto que son requeridos para la hidrólisis de ATP y GTP (Jones and Jones, 1997). Un número elevado de secuencias que codifican NBS, han sido identificados a través de clonación y amplificación con PCR, utilizando primers degenerados y proyectos de secuenciación de genoma (Meyers et al., 1999).

En las secuencias NBS de proteínas de resistencia (R), se han reconocido al menos cinco motivos conservados, el más común es el loop de unión a fosfato o “P-loop” (también conocido como motivo A o Walter A) indicando que están relacionados con proteínas de unión a ATP y GTP (Saraste et al., 1990). Adicionalmente se encuentran los motivos kinasa-2, kinasa-3a y GLPL (Tameling et al., 2002). La Figura 1-3 representa los dominios TIR/CC, LRR y NBS y dentro de este último dominio los motivos con secuencias altamente conservadas.

Figura 1- 3. Dominios y motivos característicos en genes CC/TIR-NBS-LRR.



1.6.2 Dominio con repeticiones ricas en leucina (LRR)

La mayoría de genes *R* codifican proteínas que contienen una región con repeticiones ricas en leucina LRR (Jones and Jones, 1997). En mamíferos se ha demostrado que esta región está involucrada en las interacciones proteína-proteína y en los procesos de transducción de señales (Kobe and Deisenhofer, 1995). En plantas la región LRR contribuye a la especificidad en el reconocimiento del patógeno (Hammond-Kosack and Jones, 1997).

En la interacción, inicialmente el reconocimiento del patógeno se da por el dominio LRR. Este dominio que se ha identificado como un factor involucrado en la especificidad del reconocimiento del patógeno, adicionalmente, puede tener una función reguladora negativa en proteínas de tipo NBS-LRR, de tal manera que cuando se elimina el dominio LRR, se causa una activación constitutiva de las respuestas de defensa. Así, la presencia de un efector codificado por el gen *Avr*, es reconocido por el dominio LRR, lo que permite un cambio conformacional en la proteína y por lo tanto la eliminación de la regulación negativa. Esto genera cambios en el dominio NBS, como el paso de ADP a ATP, y de esta forma se inicia la activación de la cascada de señalización, conduciendo a las respuestas de defensa. En el caso del modelo del gen guarda, la interacción entre los efectores con los blancos de patogenicidad produce un cambio estructural o conformacional, el cual es reconocido por el gen *R* y permite su activación conduciendo a la respuesta de resistencia.

Las proteínas *R* de la clase NBS-LRR, conforman una familia de genes altamente conservada y son abundantes en genomas de plantas. Hasta el momento se han identificado 150 en *Arabidopsis* (Meyers et al., 2003) y cerca de 600 en arroz (Monosi et al., 2004). Las secuencias NBS no-TIR son altamente abundantes en el genoma de arroz, pero las secuencias que codifican TIR son raras, o ausentes en monocotiledóneas (Meyers et al., 1999).

1.7 Homólogos de genes de resistencia: RGHs.

La identificación de los dominios conservados en las proteínas *R*, ha permitido identificar genes de resistencia en diferentes especies de plantas, utilizando PCR con primers degenerados diseñados a partir de secuencias presentes en los motivos conservados (Sheng *et al.* 1998). Las secuencias amplificadas al usar esta metodología se han denominado análogos de genes de resistencia (RGAs) (Kanazin et al., 1996), genes de resistencia candidatos (RGCs) (Shen et al., 1998) y homólogos de genes de resistencia (RGH).

Los análisis genéticos han asociado estas secuencias a genes que confieren resistencia a virus, hongos, bacterias y nematodos (Palomino et al., 2006). Por lo tanto esta metodología se ha convertido en una estrategia útil para aislar múltiples secuencias candidatas a genes de resistencia, que pueden ser usadas para el desarrollo de marcadores moleculares útiles en SAM o conducir a la clonación molecular de genes de resistencia (Kanazin et al., 1996; Leister et al., 1996, 1998; Yu et al., 1996; Geffroy et al., 1999; Mutlu et al., 2006).

El trabajo de Kanazin et al. (1996), fue la primera investigación donde se reveló la posibilidad de usar la homología de secuencias a partir de motivos conservados, presentes en genes de resistencia clonados, para identificar loci candidatos de resistencia de diversos taxa en plantas. En este estudio Kanazin et al. (1996), a partir de primers degenerados, diseñados de secuencias conservadas en las regiones codificantes de los genes de resistencia *N* de tabaco, *RPS2* de *Arabidopsis* y *L6* de lino, identificaron nueve clases de RGAs que mapearon en ocho grupos de ligamiento, algunos cerca de genes conocidos de resistencia.

1.7.1 Homólogos de genes de resistencia en fríjol

En el GenBank se han reportado 67 secuencias obtenidas mediante la amplificación de primers degenerados, diseñados a partir de la región NBS de genes de resistencia en fríjol (Creusot et al., 1999; de Oliveira et al., unpublished ; Geffroy et al., 1999, 2009; Rivkin et al., 1999; Ferrier-Cana et al., 2003, 2005; López et al., 2003; Vallejos et al., 2006; Hanai et al., 2010). La Tabla 1-3, presenta un resumen de las secuencias que se han reportado en el GenBank y que han sido obtenidas mediante la técnica de homólogos/análogos de genes de resistencia. Los genotipos BAT93 y JaloEEP558 han sido los más utilizados en este tipo de trabajos, pertenecientes al acervo mesoamericano y andino respectivamente.

Rivkin et al. (1999) identificaron 14 secuencias, las cuales se agruparon en ocho clases diferentes. El mapeo de estos RGA se realizó en las poblaciones RIL Sierra x Olathe y Jamapa x Calima. El marcador RGA SB3 mapeó a 17.8cM del locus *Ur-6*, el cual confiere resistencia a la roya.

Creusot et al. (1999), usaron como sonda la secuencia del marcador RAPD PvH20 y evaluaron las librerías genómica y de cDNA de la línea de frijol PR12 (Co-2) y aislaron un clon genómico y dos cDNA parciales (cD7 y cD8). La secuenciación de ADN reveló que el fragmento genómico de 6.1 Kb contenía secuencias que codificaban NBS-LRR (ORF1) y productos parecidos a quinasas (ORF2); los dos cDNAs parciales pertenecían a la subfamilia NBS-LRR como la mayoría de los genes de resistencia clonados hasta el momento. El dominio LRR del ORF1 es interrumpido por dos codones de parada sugiriendo que este corresponde a miembros no funcionales de la familia multigénica o codifican una proteína truncada y de manera similar el ORF2 parece ser un pseudogen. Los tres polipéptidos NBS-LRR comparten un alto nivel de identidad de aminoácidos y representan diferentes miembros de una familia relacionada. En el mapeo genético CD8 se ubicó a 2 cM de Co-2 y 3 cM de ORF1; cD7 mapeó a 1 cM de ORF1 y co-segregó con Co-2, así cD7 puede ser un candidato putativo para el gen Co-2. El aislamiento de tres miembros homólogos de la familia multigénica y la presencia de muchos RGAs sugiere que la resistencia aún no descrita a ciertas razas de *C. lindemuthianum* u otros patógenos puede residir en este locus (Geffroy et al., 1999).

En el trabajo reportado por Ferrier-Cana et al. (2003), utilizaron librerías cDNA del genotipo Mesoamericano BAT93 y el genotipo Andino JaloEEP558, para identificar genes *R* que se expresaran, utilizando la sonda *PRLJ1* (Geffroy et al., 1999). Esto les permitió la identificación de cuatro cDNAs con alta similaridad a genes *R* que codifican proteínas *R* de tipo NBS-LRR.

López et al. (2003), a partir de primers diseñados de los dominios NBS y TIR, obtuvieron cinco RGAs que mapearon en regiones genómicas, con QTL asociados con resistencia a antracnosis, específicamente a los aislamientos 5DOM, 235COL, 289COL, 20COL, 43COL y 77CRI de *C. lindemuthianum*. Dos fragmentos polimórficos del RGA1 estuvieron a un intervalo de 9 cM y explicaron el 41.4% y 23.2% de la resistencia frente al aislamiento 43COL. El RGA2a que presentó un R^2 de 0.15 frente al aislamiento 5DOM, se localizó en el GL 04B en la misma región de los RGAs PRLB y PRLJ previamente reportados por Geffroy et al. (1999), y el RGA2b co-segregó con el RGA1a en el GP 11. El RGA 7 estuvo asociado con la resistencia a los aislamientos de antracnosis 43COL ($r^2=0.242$) y 5DOM ($r^2= 0.12$) y se ubicó en el GL 10. En este grupo de ligamiento no se

había podido ubicar ningún gen de resistencia a antracnosis, estos resultados sugieren que la metodología basada en RGAs es útil para genes de resistencia que de otra manera podrían ser subestimados.

Ferrier-Cana et al. (2005), evaluaron la librería de cDNA de JaloEEP558 e identificaron siete cDNA con alta similaridad a genes *R* que codifican proteínas R del tipo NBS-LRR. Los siete transcritos son codificados por el gen denominado *JA1tr*, por ser el primer gen candidato de resistencia truncado aislado del genotipo JaloEEP558. Estos transcritos resultan de distintas modificaciones post-transcripcionales de *JA1tr* correspondientes a eventos de splicing alternativo de dos intrones, omisión de exón y múltiples eventos de empalmes aberrantes en el marco de lectura abierto. Este fue el primer reporte de transcritos truncados no TIR NBS-LRR, provenientes de empalmes alternativos.

Miklas et al. (2006), utilizaron la técnica de RGAP (R-gene analog polymorphism) diseñando primers a partir del dominio quinasa 1a y el dominio GLPLAL de proteínas codificadas por genes de resistencia y de secuencias reportadas en bases de datos de ESTs de genes de resistencia. En total 32 marcadores RGAP fueron mapeados en la población RIL BAT93 X JaloEEp558 y algunos mapearon cerca a genes de resistencia previamente reportados.

Hanai et al. (2010), utilizaron la metodología NBS-profile para la identificación de marcadores que hacen parte o están cerca de genes de resistencia de interés. Esta metodología se basa en la digestión de ADN genómico con una enzima de restricción y la ligación con adaptadores. Para la amplificación por PCR se utiliza como primer forward una secuencia diseñada a partir dominio NBS (primer degenerado) y como primer reverso se utiliza una secuencia complementaria al adaptador. En el trabajo realizado por Hanai et al. (2010), 4 combinaciones de primers fueron evaluadas, las cuales amplificaron 194 loci de los cuales 32 fueron polimórficos al evaluar BAT93 y JaloEEP558. Sin embargo, al secuenciar 16 de estos fragmentos solo cinco correspondían a secuencias con similaridad a genes de resistencia. Estos cinco marcadores fueron mapeados en los grupos de ligamiento b10 y b11 en la población RIL BAT93 x JaloEEP558.

Adicionalmente, Mutlu et al. (2006), evaluaron 100 combinaciones de primers diseñados a partir del motivo P-loop y el dominio hidrofóbico de genes de resistencia de tipo NBS-LRR. Sin embargo, los marcadores obtenidos corresponden a marcadores tipo RGAP (Resistance Gene Analog Polymorphism). En los marcadores RGH una vez se amplifican los primers, los amplicones son clonados y secuenciados para confirmar su secuencia y establecer si corresponde o no a un RGH. Los marcadores RGAPs aunque son amplificados a partir de primers diseñados de motivos característicos de genes de resistencia, una vez son amplificados, los amplicones no son clonados ni secuenciados, por lo tanto no se puede confirmar si estos corresponden o no a secuencias relacionadas con genes de resistencia. 32 marcadores polimórficos fueron mapeados en la población RIL en 72 líneas recombinantes de la población BAT93xJaloEEP558, en 10 grupos de ligamiento. Algunos de estos marcadores RGAP mapearon en grupos de ligamiento donde se han identificado tanto genes *R* como QTL que confieren resistencia a diferentes enfermedades como antracnosis, CBB y roya, marchitamiento vascular (*Fusarium oxysporum* f.sp. phaseoli), tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola). Los marcadores polimórficos mapeados tuvieron un tamaño variable con un rango entre 280 y 1250pb, por lo que muchos de estos marcadores pueden no corresponder a homólogos de genes de resistencia, debido a que en algunos trabajos se ha establecido que secuencias muy largas o cortas al ser secuenciadas no evidencian similitud con secuencias de genes de resistencia (Rivkin et al., 1999; López et al., 2003).

Tabla 1- 3. Descripción de secuencias reportadas en el Genbank asociadas con homólogos/análogos de genes de resistencia en frijol.

Genotipo	No. de primers/sondas diseñados a partir de la región NBS	No. de RGH/ RGA identificados /mapeados	Grupos de RGH	Población de mapeo	RGA	GL	R – QTL	R ²	Patógeno	Motivos identificados en el dominio NBS	
Sierra Olathe	20 (18 específicos para frijol)	14	8	103 líneas RIL F:6 Sierra x Olathe	SB3 OB1	ND2 ND4	17.8 cM <i>Ur-6</i>		<i>U. appendiculatus</i>	Kin-2: (LVLDD) Kin-3: (FGNGSR)	(Riv 199
				76 líneas RIL F:8 Jamapa x Calima	SB8c SB8a OB1,OB2,SB1,SB3,SB5 OB3,OB5,OB6,OB7	<i>B</i> <i>D</i> <i>I</i> <i>F</i>					
Líneas: P12R EO2 Corel	1	3		49 líneas RIL EO2 x Corel	ORF1 cD7 cD8	B11					(Cre al.,
BAT93 JaloEEP 558	4	4	2	77 líneas RIL BAT93xJaloEEP 558	BA8 BA11 JA71 JA78	B4	<i>Co-9</i> <i>Co-9</i> <i>Co-y</i>		<i>C. lindemuthianum</i>	P-loop LGKTTLAQHVV(S N) Kin-2 (RK)F(LF)LVLDDV W Kin-3 SRIL(VF)TTR	(Fer et al
BAT JaloEEP 558	4	5*		74 líneas RIL F:8 BAT93xJaloEEP 558	RNF356 RRF380 RNF475 RRF410 RNF330	b10 b10 b11 b11 b11	<i>Co-2, Ur-3, Ur-11, Ur-Dorado</i>		<i>C. lindemuthianum</i> <i>U. appendiculatus</i>		(Har 201
BAT93 JaloEEP 558	1			77 líneas RIL F:9 BAT93xJaloEEP 558	JA1tr	B4	<i>Co-y/Co-9</i>		<i>C. lindemuthianum</i>		(Fer et al
BAT93 JaloEEP 558	1	25**	4	77 líneas RIL F:9 BAT93xJaloEEP 558	CNL-B (3,7,8,11,16,17,18,19,22,23), CNL-J (1,3,9,5)	B4	<i>Co-y/Co-9</i>		<i>C. lindemuthianum</i>		(Ge al.,
Sprite		9		76 líneas RIL	Bng45	B2	<i>Locus I</i>		BCMV	P-loop	(Val

Genotipo	No. de primers/sondas diseñados a partir de la región NBS	No. de RGH/ RGA identificados /mapeados	Grupos de RGH	Población de mapeo	RGA	GL	R – QTL	R ²	Patógeno	Motivos identificados en el dominio NBS	
				3056 plantas F2 Calima x Jamapa						GVGKTT Kin-2 LLVLDDVW GLPL CGGLPLA	al., 2
DOR364 G19833	4*** 2****	15	8 7	87 líneas RIL F:9 DOR364 x G19833	RGA4c	B1				Kin-2: (LV)(LVI)(VIM)LD(D NG)(VIL)(DW) RNBS-B: (GQK)(SC)(RKC)(V IF)(VIL)(IVF)T(TS) R(DSG)	(Lóp 200
					RGA5a,RGA5b	B2					
					RGA4a	B3					
					RGA2a	B4		0.15 y 0.137	<i>C. lindemuthianum</i> (5DOM)-BGYMV		
					RGA6			np	<i>C. lindemuthianum-P.griseola</i>		
					RGA14			np	<i>C. lindemuthianum-P.griseola</i>		
					RGA4b	B7					
					RGA15a RGA15c	B8					
					RGA7	b10		47.1 y 63.9 0.242 0.12 np	<i>P. griseola</i> (30CRI), (12MEX) <i>C. lindemuthianum</i> (43COL) <i>C. lindemuthianum</i> (5DOM) <i>P. griseola</i>		
					RGA 9 RGA 10c RGA 12 RGA 15b			np np	<i>P. griseola</i> <i>P. griseola</i>		
					RGA1a-RGA2b RGA1b	b11		41.4 23.2	<i>C. lindemuthianum</i> (43COL) <i>C. lindemuthianum</i> (43COL)		

*Secuencias obtenidas por NBS profile. Al secuenciar 19 de estas secuencias solo 5 correspondieron a RGH.

** 25 secuencias de las cuales 11 corresponden a pseudogenes

*** Incluye un primer diseñado a partir de secuencias conservadas en el motivo RNBS-D, asociadas a proteínas de tipo TIR-NBS

**** Primers diseñados a partir del dominio TIR de genes de resistencia

np: dato no publicado

1.8 Mapeo genético y QTL

1.8.1 Loci de características cuantitativas QTL

Las características que varían de manera cuantitativa, son usualmente controladas por la acción de muchos genes y la expresión fenotípica se ve modificada por efecto del ambiente. El efecto genético y ambiental puede variar de acuerdo a la característica que se esté analizando. Los genes que controlan la variación de las características cuantitativas se denominan QTL (quantitative trait loci). El mapeo de QTLs consiste en identificar la localización y estimar los efectos de los QTL utilizando mapas genéticos (Tanksley, 1993).

En contraste con la resistencia cualitativa, poco se conoce acerca de la estructura de los loci de resistencia cuantitativa QRLs (Poland et al., 2009). Esto puede deberse que los QRLs implican un intervalo de un cromosoma, que en algunos casos corresponde a cientos o miles de genes (Balint-Kurti and Johal, 2009), por lo tanto la identificación de los genes que gobiernan la resistencia cuantitativa es compleja y la determinación de su función no es fácil.

El estudio de los genes de resistencia cuantitativos muchas veces se basa en el mapeo de QTL asociados a la característica de interés. Para este fin se construyen mapas genéticos o de ligamiento y se realizan evaluaciones fenotípicas, que permiten la identificación de intervalos o marcadores asociados con la resistencia. Las poblaciones que se utilizan para el estudio de QTL varían en su estructura, incluyendo poblaciones F2/F3, retrocruzamientos (RC), dobles haploides (DHs), líneas endogámicas recombinantes (RILs), líneas isogénicas recombinantes (NILs) y cepas congénicas recombinantes entre otras (Kearsey and Farquhar, 1998; Broman and Sen, 2009).

1.8.2 Mapas de ligamiento

Dentro de los requerimientos que se deben tener en cuenta para la construcción de un mapa de ligamiento se encuentra el polimorfismo entre los parentales para la característica a ser evaluada y la construcción de una población segregante. El tamaño de la población usada en estudios de mapeo genético preliminares generalmente varía entre 50 a 250 individuos, sin embargo poblaciones más grandes se requieren para el mapeo fino o de alta resolución (Revisado en Collard et al., 2005).

La ubicación de los marcadores en los mapas de ligamiento se basan en: la menor distancia entre marcadores, la máxima probabilidad (*maximun likelihood*) de que dos marcadores se encuentren ligados y la menor probabilidad de que se realicen múltiples recombinaciones (Young, 1994). El valor LOD corresponde al logaritmo (en base 10) de la razón entre la probabilidad de que dos marcadores estén ligados frente a la probabilidad de que no hay ligamiento (Young, 1994). Por ejemplo una probabilidad de recombinación observada de 5 con un LOD=4.0 significa que es 10.000 veces más probable que dos marcadores se encuentren ligados a que no lo estén y por tanto la probabilidad de recombinación será del 50%, es decir que los marcadores se heredan de manera independiente (Semagn et al., 2010).

Las funciones de mapeo son otro factor importante en la construcción de los mapas de ligamiento, debido a que permiten corregir y determinar la distancia final entre dos marcadores, expresada en centimorgans (cM) o Morgans a partir de las frecuencias de recombinación. Aunque existen alrededor de ocho funciones de mapeo, las más utilizadas corresponden a la función de Haldane y Kosambi, siendo la última más utilizada por considerar interferencia en los eventos de recombinación y de esta manera se obtienen estimaciones más precisas (Broman, 2009).

En frijol, utilizando RFLP se obtuvieron tres mapas genéticos: el de Davis (Gepts et al., 1993; Nodari et al., 1993), el de Florida (Vallejos et al., 1992) y el de Paris (Adam-Blondon et al., 1994). Freyre et al. (1998), utilizaron la población endogámica recombinante del cruce entre BAT93 y Jalo EEP558 (BJ), para obtener un mapa de ligamiento consenso. La población BJ, muestra un alto nivel de polimorfismo para marcadores de tipo RFLP y otros

marcadores, dado que los parentales pertenecen al acervo genético Mesoamericano y Andino, respectivamente (Kelly et al., 2003). Hanai et al. (2010) adicionaron a este mapa consenso 282 nuevos marcadores tipo EST-SSR, AFLP y algunos RGA putativos identificados mediante NBS-profile. Este mapa está constituido por 413 marcadores de ADN, distribuidos en los 11 grupos de ligamiento y con una longitud total de 1.259 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 3 cM.

Otra población importante para diferentes estudios genéticos y/o de mapeo son las líneas endogámicas recombinantes derivadas del cruce DOR364 X G19833. Cuenta con un gran número de marcadores microsatélite y una longitud total de 1.397 cM con una distancia promedio entre marcadores de 6 cM (Blair et al., 2008; Córdoba et al., 2010).

1.8.3 Detección de QTL

Para la detección de QTL es necesario contar con los datos de genotipificación, es decir la evaluación de los marcadores en todos los individuos que conforman la población bajo estudio, ya sea RIL, F2, dobles haploides etc. Esta evaluación permite la construcción del mapa genético o de ligamiento. Una vez el mapa está construido las evaluaciones fenotípicas son utilizadas para la identificación de los QTL. Dentro de las evaluaciones fenotípicas, al estar evaluando características cuantitativas, controladas por muchos genes y modificadas por el ambiente, se espera que los datos tengan una distribución continua o normal. En caso contrario, será necesario realizar transformación de los datos, para cumplir con este requisito.

Un gran número de programas se han desarrollado para la identificación de QTL: QGene, Map Maker, Cartographer (con su interfaz en Windows WinQTL – Cartographer), MapQTL, PROC QTL y R-QTL, entre otros (Broman, 2009; Semagn et al., 2010). La diferencia entre estos programas se da en la precisión con la cual son identificados los QTL, algunos programas están limitados a cierto tipo de poblaciones, la interfaz o accesibilidad al programa y el tipo de análisis que permite hacer (p.e. MIM, CIM) (Semagn et al., 2010).

Dentro de las metodologías empleadas para la identificación de QTL se encuentra el análisis de marcador simple, análisis de intervalo y análisis de intervalo compuesto.

El análisis de marcador simple permite hacer un análisis preliminar y confirmar que no haya errores en la matriz de genotipificación, como por ejemplo datos perdidos que puedan afectar las estimaciones de los QTL, además no requiere un mapa genético completo. Este tipo de análisis se basa en la asociación entre un marcador y una característica, por lo que la posición exacta del QTL no puede ser determinada y los efectos son sub-estimados (Broman, 2009; Semagn et al., 2010). Este análisis utiliza pruebas de t , análisis de varianza y regresión lineal, por lo que se pueden realizar en programas que tengan estadística básica, aunque también está incluido dentro de la mayoría de programas diseñados para análisis de QTL (Semagn et al., 2010).

El mapeo de intervalo es el siguiente paso al mapeo por análisis de marcador simple. Este es un método estándar que permite realizar un análisis preliminar de los datos en el que se usan dos marcadores adyacentes para construir un intervalo en el cual realizar la búsqueda del QTL. Una función de mapa es usada para calcular la distancia en cM a partir de las frecuencias de recombinación. El LOD score es calculado en cada incremento (*step walking*) en el intervalo. Una vez se tienen los valores LOD para todo el genoma, los picos que han excedido el valor del umbral son identificados como QTL (Broman, 2009). Un valor de LOD alto controla el error Tipo 1, es decir declarar un falso QTL. Sin embargo, hay que establecer bien este valor, porque valores muy altos pueden eliminar un QTL de interés. Un QTL significativo presenta una probabilidad mayor a 0.05 y explica un valor alto (mayor al 10%) de la varianza fenotípica (R^2). El valor LOD indica la posición más probable del QTL. Este valor también se puede expresar como *LRO*, utilizando la fórmula:

$$LRO = 4.605 \times LOD$$

Si en el mapa genético existen distancias genéticas mayores a 20cM, esta metodología es recomendada. Posteriormente se hacen análisis más complejos y precisos como mapeo de intervalo compuesto (MIC), mapeo de intervalo múltiple (MIM) y mapeo de intervalo bayesiano (MIB).

El mapeo por intervalo compuesto (MIC), combina el mapeo de intervalo con la regresión lineal. Además del par de marcadores adyacentes utilizados en el mapeo por intervalo, incluye marcadores genéticos adicionales en cada análisis para controlar la varianza causada por otros QTL (Broman, 2009). La principal ventaja de este análisis es una mayor precisión y efectividad en la identificación de QTL comparado con los métodos anteriores, especialmente cuando hay QTL cercanos o ligados (Collard et al., 2005).

En este tipo de análisis se debe especificar un modelo, que determina el número de marcadores que serán utilizados como co-factores. El Modelo 6 es el más empleado y debe especificarse el tamaño de ventana, número de marcadores control, y método de regresión. Con un tamaño de ventana de 10, el genoma será leído en intervalos de 10 cM. La regresión backward y forward hace referencia a la selección que hace el programa de los marcadores informativos, de tal manera que cuando avanza en el genoma, rectifica si los marcadores seleccionados dan la mejor información o si a medida que avanza encuentra marcadores más informativos y los va modificando, esta “rectificación” la hace hacia adelante y hacia atrás. Al incrementar el número de marcadores control, se obtiene una mejor resolución para el mapeo de QTL.

Adicionalmente debe especificarse la velocidad de caminado y el número de permutaciones. La velocidad de caminado determinará cada cuantos cM el programa buscare los QTL. Por ejemplo una velocidad de caminado de 2, indica que el intervalo para la búsqueda de QTL va a ser cada 2 cM. Se debe utilizar el mismo valor para todo el análisis, para que los resultados puedan ser comparables. Cuando los mapas de ligamiento cuentan con número apropiado de marcadores, un valor de caminado de 1cM es recomendado. Un incremento en la velocidad de caminado, disminuye el tiempo que toma el programa en hacer el análisis, pero así mismo disminuye la precisión de los resultados (Basten et al., 2002).

Los valores umbral de LOD determinan la existencia de un QTL y se pueden determinar mediante permutaciones. En cada permutación los datos cuantitativos o fenotípicos se permutan mientras que los datos de los marcadores permanecen fijos. Posteriormente, el mapeo por intervalo se realiza en el este conjunto de datos obtenidos. La máxima

puntuación LOD (o desviación) en cada grupo de ligamiento, así como sobre todos los grupos de ligamiento (el genoma) se observa en cada permutación (Churchill and Doerge, 1994). La identificación de los valores LOD por medio de permutaciones puede tomar un lapso de tiempo considerable (1000 permutaciones puede tomar 2-3 horas), pero los QTL identificados son más precisos.

El valor R^2 expresa la proporción de la varianza fenotípica que es expresada por un QTL. Este valor puede ser expresado como el cociente de verosimilitud (LR) y equivale a dos veces el logaritmo en base 10 de la máxima probabilidad de que no hay un QTL ligado a un marcador contra la hipótesis de que existe un QTL ligado a un marcador en una región particular del genoma (Staub et al., 1996). La siguiente formula expresa esta relación:

$$LR = -2 \ln L_0 / L_1 = -2 \ln 10 - LOD$$

Bibliografia

- Adam-Blondon, A.F., M. Sévignac, H. Bannerot, and M. Dron. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 88(6/7): 865–870.
- Alzate-Marín, A.L., K.M. Arruda, K.A. Souza, E.G. Barros, and M.A. Moreira. 2004. Introgression of Co-42 and Co-5 anthracnose resistance genes into “Carioca” Common bean cultivars. *Crop Breeding Appl. Biotechnol.* 4: 446:451.
- Alzate-Marin, A.L., G.S. Baía, T.J. de Paula Júnior, G.A. de Carvalho, E.G. de Barros, and M.A. Moreira. 1997. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB 136. *Plant Disease* 81(9): 996–998.
- Alzate-Marin, A.L., M.R. Costa, E.G. de Barros, and M.A. Moreira. 2001. Characterization of the anthracnose resistance locus present in cultivar Ouro Negro (Honduras 35). *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.* 44: 115–116.
- Alzate-Marin, A.L., K.A. de Souza, M.G. de M. Silva, E.J. de Oliveira, M.A. Moreira, and E.G. de Barros. 2007. Genetic characterization of anthracnose resistance genes Co-43 and Co-9 in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262). *Euphytica* 154(1/2): 1–8.
- Araya, C.M. 2003. Coevolución de interacciones hospedante - patógeno en frijol común. *Fitopatologia Brasileira* 28: 221 – 228.
- Awale, H.E., and J.D. Kelly. 2001. Development of SCAR markers linked to Co-42 gene in common bean. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.* 44: 119–120.
- Balardin, R.S., A.M. Jarosz, and J.D. Kelly. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. *Phytopathology* 87(12): 1184–1191.
- Balardin, R.S., and J.D. Kelly. 1998. Interaction among races of *Colletotrichum lindemuthianum* and diversity in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123(6): 1038–1047.
- Balint-Kurti, P.J., and G.S. Johal. 2009. Maize Disease Resistance. In: *Handbook of Maize: Its Biology*, eds JL Bennetzen and SC Hake. Springer, pp 229-250.
- Bannerot, H. 1965. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. 15: 201–222.
- Barrus, M.F. 1911. Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose.
- Barrus, M.F. 1915. An anthracnose-resistant red kidney bean. *Phytopathology* 5: 303–311.

- Basten, C.J., B.S. Weir, and Z.B. Zeng. 2002. QTL Cartographer, Version 1.16. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Becerra Velásquez, V.L., and P. Gepts. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* 37(2): 256–263.
- Bent, A.F., and D. Mackey. 2007. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45(1): 399–436.
- Broman, K.W. 2009. A guide to QTL mapping with R/qtl / (S Sen, Ed.). Springer,, New York :
- Broman, K.W., and S. Sen. 2009. A Guide to QTL Mapping with R/qtl. New York: Springer.
- Broughton, W.J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. 252(1): 55–128.
- Bryson, R.J., C.E. Caten, D.W. Hollomon, and J.A. Bailey. 1992. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*.
- Campa, A., C. Rodríguez-Suárez, A. Pañeda, R. Giraldez, and J.J. Ferreira. 2005. The bean anthracnose resistance gene Co-5, is located in linkage group B7. *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.* 48: 68–69.
- Cannon, S.B., H. Zhu, A.M. Baumgarten, R. Spangler, G. May, D.R. Cook, and N.D. Young. 2002. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *Journal of Molecular Evolution* 54(4): 548–562.
- Chiorato, A.F., S.A.M. Carbonell, R.R. de Moura, M.F. Ito, and C.A. Colombo. 2006. Co-evolução entre raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro. *Bragantia* 65: 381 – 388.
- Churchill, G.A., and R.W. Doerge. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963–971.
- Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer, and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142(1/2): 169–196.
- Creusot, F., C. Macadré, E.F. Cana, C. Riou, V. Geffroy, M. Sévignac, M. Dron, and T. Langin. 1999. Cloning and molecular characterization of three members of the NBS-LRR subfamily located in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris*. *Genome* 42(2): 254–264.

- Dangl, J.L., and J.D.G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature (London)* 411(6839): 826–833.
- Debouck, D.G., O. Toro, O.M. Paredes, W.C. Johnson, and P. Gepts. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. *Economic Botany* 47(4): 408–423.
- Delgado-Salinas, A., A. Bonet, and P. Gepts. 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. *Gen. Res. Phaseolus Beans*: 163–184.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. En: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Consulta: Noviembre, 2011.
- Fenalce. 2010. Indicadores sectoriales frijol.
- Ferrier-Cana, E., V. Geffroy, C. Macadré, F. Creusot, P. Imbert-Bolloré, M. Sévignac, and T. Langin. 2003. Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 106(2): 251–261.
- Ferrier-Cana, E., C. Macadré, M. Sévignac, P. David, T. Langin, and V. Geffroy. 2005. Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC-NBS-LRR gene JA1tr of *Phaseolus vulgaris*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 110(5): 895–905.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev Phytopathol* 9: 275–296.
- Fouilloux, G. 1979. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs.
- Freyre, R., P.W. Skroch, V. Geffroy, A.F. Adam-Blondon, A. Shirmohamadali, W.C. Johnson, V. Llaca, R.O. Nodari, P.A. Pereira, S.M. Tsai, J. Tohme, M. Dron, J. Nienhuis, C.E. Vallejos, and P. Gepts. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theoretical and Applied Genetics* 97(5/6): 847–856.
- Geffroy, V., F. Creusot, J. Falquet, M. Sévignac, A.F. Adam-Blondon, H. Bannerot, P. Gepts, and M. Dron. 1998. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* 96(3/4): 494–502.
- Geffroy, V., C. Macadré, P. David, A. Pedrosa-Harand, M. Sévignac, C. Dauga, and T. Langin. 2009. Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181(2): 405–419.

- Geffroy, V., D. Sicard, J.C.F. de Oliveira, M. Sévignac, S. Cohen, P. Gepts, C. Neema, T. Langin, and M. Dron. 1999. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(9): 774–784.
- Gepts, P. 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. p. 215–241, 602–603. *In* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gepts, P. 1998. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. 33(7): 1124–1130.
- Gepts, P., F.J.L. Aragão, E. de Barros, M.W. Blair, R. Brondani, W. Broughton, I. Galasso, G. Hernández, J. Kami, P. Lariguet, P. McClean, M. Melotto, P. Miklas, P. Pauls, A. Pedrosa-Harand, T. Porch, F. Sánchez, F. Sparvoli, and Yu KangFu. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. p. 113–143. *In* Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, Volume 1. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.
- Gepts, P., and D. Debouck. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 7–53. *In* CAB International, Wallingford.
- Gepts, P., R. Nodari, S.M. Tsai, E.M.K. Koinange, V. Llaca, R. Gilbertson, and P. Guzman. 1993. Linkage mapping in common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 36: xxiv–xxxviii.
- Goncalves-Vidigal, M.C., C.R. Silva, P.S. Vidigal-Filho, and J.P. Poletine. 2005. Characterization of anthracnose resistance gene in common bean cultivar Michelite. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.* 48: 78–79.
- Gonçalves-Vidigal, M., P. Vidigal Filho, A. Medeiros, and M. Pastor-Corrales. 2009. Common Bean Landrace Jalo Listras Pretas Is the Source of a New Andean Anthracnose Resistance Gene. *Crop Sci* 49(1): 133–138.
- Goncalves-Vidigal, M.C., P.S. Vidigal Filho, and M.A. Pastor Corrales. 2008. A New Anthracnose Resistance Gene in Andean Common Bean Cultivar Jalo Listras Pretas. *Crop Science* 49: 133–138.
- González-Chavira, M., R. Rodríguez Guerra, F. Hernández-Godínez, J.A. Acosta-Gallegos, O. Martínez de la Vega, and J. Simpson. 2004. Analysis of pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* found in the central region of Mexico and resistance in elite germ plasm of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Disease* 88(2): 152–156.
- Guzmán, P., Donado, M.R., and Galvez, G.E. 1979a. Pérdidas económicas causadas por la antracnosis del frijol *Phaseolus vulgaris* en Colombia. *Turrialba* 29: 65–67.

- Guzmán, P., Donado, M.R., and Galvez, G.E. 1979b. Control químico de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en Colombia. Control químico de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en Colombia. Turrialba.
- Hammond-Kosack, K.E., and J.D.G. Jones. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48(1): 575–607.
- Hanai, L.R., L. Santini, L.E.A. Camargo, M.H.P. Fungaro, P. Gepts, Tsai SiuMui, and M.L.C. Vieira. 2010. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. *Molecular Breeding* 25(1): 25–45.
- van der Hoorn, R.A.L., and S. Kamoun. 2008. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell Online* 20(8): 2009 – 2017.
- Jones, D.A., and J.D.G. Jones. 1997. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. In: Andrews, J.H. Tommerup IC (eds) *Advances in botanical research*. Academic Press Incorporated, San Diego, pp 89–167.
- Kami, J., V.B. Velásquez, D.G. Debouck, and P. Gepts. 1995. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(4): 1101–1104.
- Kanazin, V., L.F. Marek, and R.C. Shoemaker. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11746–11750.
- Kearsey, M.J., and A.G.L. Farquhar. 1998. QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity* 80(2): 137–142.
- Kelly, J.D. 2010. Anthracnose. Available at http://www.css.msu.edu/bic/_pdf/Anthracnose.pdf.
- Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas, and D.P. Coyne. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research* 82(2/3): 135–154.
- Kelly, J.D., and M. Melotto. 1999. Biotechnology advances and address at the National Bean Improvement Conference, VI Renafe Meeting, Salvador, Bahia, Brazil. Noviembre 21-26.
- Kelly, J.D., and V.A. Vallejo. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience* 39(6): 1196–1207.
- Kobe, B., and J. Deisenhofer. 1995. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 374(6518): 183–186.

- Lanaud, C., A.M. Risterucci, I. Pieretti, J.A.K. N'Goran, and D. Fargeas. 2004. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (<i>Theobroma cacao</i> L.). *Molecular Breeding* 13(3): 211–227.
- Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini, and C. Gebhardt. 1996. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genet* 14: 421–429.
- Leister, D., J. Kurth, D.A. Laurie, M. Yano, T. Sasaki, K. Devos, A. Graner, and P. Schulze-Lefert. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(1): 370–375.
- López, C.E., I.F. Acosta, C. Jara, F. Pedraza, E. Gaitán-Solís, G. Gallego, S. Beebe, and J. Tohme. 2003. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93(1): 88–95.
- Mahuku, G., C. Jara, C. Cajiao, and S. Beebe. 2002. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. *Plant disease* 86(12): 1383–1387.
- Mastenbroek, C. 1960. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. *Euphytica* 9(2): 177–184.
- Melotto, M., R.S. Balardin, and J.D. Kelly. 2000. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: “Colletotrichum host specificity, pathology, and host-pathogen interaction”. D. Prusky, S. Freeman, and M.B. Dickman (eds.), pp 346-361. APS Press, St Paul, MN, USA.
- Melotto, M., and J.D. Kelly. 2001. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. *Theoretical and Applied Genetics* 103(4): 508–517.
- Méndez-Vigo, B., C. Rodríguez-Suárez, A. Pañeda, J.J. Ferreira, and R. Giraldez. 2005. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. *Euphytica* 141(3): 237–245.
- Meyers, B.C., A.W. Dickerman, R.W. Michelmore, S. Subramoniam, B.W. Sobral, and N.D. Young. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal* 20(3): 317–332.
- Meyers, B.C., A. Kozik, A. Griego, H.H. Kuang, and R.W. Michelmore. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(4): 809–834.
- Michelmore, R. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 33: 393–427.

- Michelmore, R. 2000. Genomic approaches to plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3(2): 125 – 131.
- Miklas, P.N., J.D. Kelly, S.D. Beebe, and M.W. Blair. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105–131.
- Monosi, B., R.J. Wisser, L. Pennill, and S.H. Hulbert. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 109(7): 1434–1447.
- Mutlu, N., P. Miklas, and D. Coyne. 2006. Resistance Gene Analog Polymorphism (RGAP) Markers Co-Localize with Disease Resistance Genes and QTL in Common Bean. *Molecular Breeding* 17: 127–135.
- Nodari, R.O., S.M. Tsai, R. Gilbertson, and P. Gepts. 1993. Nodari RO, Tsai SM, Gilbertson RL, Gepts P (1993 a) Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. *Theor Appl Genet* 85: 513–520.
- Palomino, C., Z. Satovic, J.I. Cubero, and A.M. Torres. 2006. Identification and characterization of NBS-LRR class resistance gene analogs in faba bean (*Vicia faba* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 49(10): 1227–1237.
- Pastor-Corrales, M.A. 1988. Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis del frijol en América Latina. En: La antracnosis del frijol común *Phaseolus vulgaris* en America Latina. Documento de trabajo No. 113. CIAT. pp.240-251.
- Pastor-Corrales, M.A., O.A. Erazo, E.I. Estrada, and S.P. Singh. 1994. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. *Plant Disease* 78(10): 959–962.
- Pei, X., S. Li, Y. Jiang, Y. Zhang, Z. Wang, and S. Jia. 2007. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.). *Plant Science* 172(6): 1166 – 1174.
- Pflieger, S., V. Lefebvre, and M. Causse. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7(4): 275–291.
- Poland, J.A., P.J. Balint-Kurti, R.J. Wisser, R.C. Pratt, and R.J. Nelson. 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci* 14(1): 21–29.
- Riascos, J. 2001. Caracterización de la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* usando marcadores moleculares. Trabajo de grado. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Cali, Colombia. 70 p.

- Rincon, R.L.J. 2007. Diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* que afecta frijol en las zonas productoras de los departamentos de Cundinamarca y Santander. Trabajo de grado M.Sc. en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, 90p.
- Rivkin, M.I., C.E. Vallejos, and P.E. McClean. 1999. Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome* 42(1): 41–47.
- Rodríguez-Suárez, C., J. Ferreira, A. Campa, A. Pañeda, and R. Giraldez. 2008. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 116(6): 807–814.
- Saraste, M., P.R. Sibbald, and A. Wittinghofer. 1990. The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15(11): 430–434.
- Schwartz, H.F., M.A. Pastor Corrales, and S.P. Singh. 1982. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 31(3): 741–754.
- Schwartz, H.F., J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster. 2005. Compendium of bean diseases. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul.
- Semagn, K., A. Bjornstad, and Y. Xu. 2010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(5): 1–45.
- Shen, K.A., B.C. Meyers, M.N. Islam-Faridi, D.B. Chin, D.M. Stelly, and R.W. Michelmore. 1998. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(8): 815–823.
- Silva, M.V., and J.B. dos Santos. 2001. Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo Co-4(2) de resistência do feijoeiro comum ao agente causal da antracnose. *Revista Ciência e Tecnologia, Lavras- MG*, v. 25, n. 5, p. 1097-1104.
- Singh, S.P., R. Nodari, and P. Gepts. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. *Crop Science* 31(1): 19–23.
- Singh, S.P., and H.F. Schwartz. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science* 50(6): 2199–2223.
- Spielmeyer, W., L. Huang, H. Bariana, A. Laroche, B.S. Gill, and E.S. Lagudah. 2000. NBS-LRR sequence family is associated with leaf and stripe rust resistance on the end of homoeologous chromosome group 1S of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 101(7): 1139–1144.
- Staub, J.E., F.C. Serquen, and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience* 31(5): 729–741.

- Tameling, W.I.L., S.D.J. Elzinga, P.S. Darmin, J.H. Vossen, F.L.W. Takken, M.A. Haring, and B.J.C. Cornelissen. 2002. The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 14(11): 2929–2939.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27: 205–233.
- Totad, A.S., B. Fakrudin, and M.S. Kuruvinashetti. 2005. Isolation and characterization of resistance gene analogs (RGAs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Euphytica* 143(1/2): 179–188.
- Vallejo, V., and J.D. Kelly. 2009. New insights into the anthracnose resistance of common bean landrace G 2333. *Open Horticulture Journal* 2: 29–33.
- Vallejos, C.E., G. Astua-Monge, V. Jones, T.R. Plyler, N.S. Sakiyama, and S.A. Mackenzie. 2006. Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 172(2): 1229–1242.
- Vallejos, C.E., N.S. Sakiyama, and C.D. Chase. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131(3): 733–740.
- Winter, P., and G. Kahl. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11(4): 438–448.
- Young, N.D. 1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers, p. 39–57, In: I. K.V. Ronald & L. Phillips (Eds.), *DNA-based markers in plants*. Kluwer, Dordrecht/ Boston/London.
- Young, R.A., and J.D. Kelly. 1996. Gene pyramiding using marker assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 39: 57–58.
- Young, R.A., M. Melotto, R.O. Nodari, and J.D. Kelly. 1998. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, “G2333”. *Theoretical and Applied Genetics* 96(1): 87–94.
- Yu, Y.G., G.R. Buss, and M.A. Saghai Maroof. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11751–11756.
- Zhang, H., Wang YueJin, Zhang ChaoHong, Wang XiPing, Li Huie, and Xu WeiRong. 2011. Isolation, characterization and expression analysis of resistance gene candidates in pear (*Pyrus* spp.). *Scientia Horticulturae* 127(3): 282–289.

2. Isolation and characterization of NBS genes homologues in common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.)



Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) production is constrained by many fungal, viral and bacterial pathogens. Thus, the identification of resistance (R) genes is an important focal point of common bean research. The main goal of our research was to identify Resistance Gene Homologues (RGH) in the plant, using degenerate primers designed from conserved sequences in the nucleotide binding site (NBS) domains of R-genes from the model legume specie *Medicago truncatula*. Total DNA of the Andean genotype G19833 was used for amplification of over 500 primer combinations. Sequencing of amplicons showed that 403 cloned fragments had uninterrupted open reading frames and were considered representative of functional RGH genes. The sequences were grouped with 90% of nucleotide identity and one representative sequence of each group was used for phylogenetic analysis. The RGH sequence diversity of common bean was divided into TIR and non-TIR families, each with different clusters. The TIR sequences grouped into 14 clades while non-TIR sequences grouped into 7 clades. Pairwise comparisons showed purifying selection, although diversifying selection was identified in some sequences. Knowledge about RGH genes in common bean can allow the design of molecular markers for pyramiding of resistance genes against various pathogens.

Key words: RGHs, common bean, phylogenetic tree, NBS, TIR, non-TIR.

Introduction

Common bean (*Phaseolus vulgaris*, L) is considered one of the most important sources of protein especially in developing countries where per capita consumption is higher than 50 kilograms in some regions (Broughton et al., 2003). The crop is cultivated in tropical, subtropical and temperate regions, in more than 100 countries around the world, with production of over 23 million tones of dry grain (FAO, 2011). Various diseases, such as angular leaf spot (caused by *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.), anthracnose [(*Colletotrichum lindemuthianum*) (Sacc. & Magnus) Lams.-Scrib.], rust [(*Uromyces appendiculatus*) (Pers.: Pers.)] and *Ascochyta* (*Phoma exigua*) constitute fungal threats to common bean production (Schwartz et al., 2005). In addition, common bean is affected by halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*), bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) and a large number of viral pathogens.

In order to reduce the impact of these diseases, different biological and chemical management strategies have been developed. However, genetic resistance is considered the most useful and advisable in both economic and environmental terms since new resistant varieties are easily adopted by farmers and do not require extraneous inputs (Miklas et al., 2006). The common bean genome, which is one of the smallest among the legumes (588-637 Mbp/haploid), has more than 60 phenotypically-described resistance genes (Bassett, 2004; McClean et al., 2008). However, these genes have been investigated in detail in just a few cases, notably for the *I* gene virus resistance (Vallejos et al., 2006) and for *Co-2* anthracnose resistance (Geffroy et al., 1998; Melotto and Kelly, 2001).

Disease resistance against pathogens in plants includes several steps. A first line of defense is dependent upon the perception of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs). This first event has been denominated “PAMP triggered immunity (PTI)”. Next, defense responses are a consequence of interaction between plant resistance protein encoded by a resistance (R) genes and pathogen effector encoded by avirulence (Avr) genes. If this interaction occurs, the event is denominated “effector triggered immunity (ETI)” (Dangl and Jones, 2001). The

relationship of *R* genes and *Avr* genes is commonly referred to as the “gene-for-gene” model of interaction (Flor, 1971).

To date, over 70 *R* genes have been cloned from various plant species (Liu et al., 2007). Comparative analysis of these *R*-genes have revealed certain conserved amino acid domains that include nucleotide-binding sites (NBS), leucine-rich repeats (LRR), transmembrane domains (TM) and serine/threonine protein kinases (PK's) arranged as separate genes or parts of individual genes in different combinations of protein domains (Hammond-Kosack and Jones, 1997; Dangl and Jones, 2001). In sequenced genomes such as *Arabidopsis thaliana* it is estimated that *R* genes are abundant and may represent more than 1% of the total number of genes (Meyers et al., 2003). More specifically, the NBS-LRR family of *R* genes can be grouped into TIR (*toll and interleukin-1 receptor*) and non-TIR sub-families, referring to a TIR domain at the N- terminus of the protein that the gene encodes (Meyers et al., 1999). Most of the proteins encoded by non-TIR type *R* genes have a coiled coil (CC) motif also known as a zipper in the N-terminus region (Pan et al., 2000a). The classification of a gene into TIR or non-TIR types can be predicted based on motifs and specific amino-acid residues in the proteins (Meyers et al., 1999). Thus, an aspartic acid (D) at the end of Kin-2 and the motifs (LQKKLLSKLL) and RNBS-D (FLHIACFF) are typical of the TIR subfamily. Meanwhile, non-TIR proteins have a triptophan (W) at the end of the Kin-2 motif and the motifs RNBS-A (FDLxAWCCVSQxF) and RNBS-D (CFLYCELPED) inside the NBS domain (Meyers et al., 1999; Peñuela et al., 2002; Xu et al., 2005).

Cloning of *R*-genes has been predominantly through a candidate gene approach either aided by genetic maps or by degenerate primers. In the latter case, highly conserved sequences in the P-loop and GLPL motifs of the NBS domain have been used to design degenerate primers which can be used to amplify *R*-genes encoded TIR and non-TIR proteins in a variety of species. The sequences amplified by these primers are defined as putative Resistance Genes Analogs (RGA) (Leister et al., 1996), Resistance Genes Candidate (RGC) (Zhang et al., 2011) or Resistance Gene Homologues (RGH) (Cannon et al., 2002) and all terminologies refers to similar amplified sequences from *R*-genes. However, we prefer to use the last of these names as it indicates that an ancestral sequences have rise to orthologous sequences in derived species.

Although RGA, RGC and RGH frequently are used as interchangeably terms, there are some clear differences between them. Analogous genes refer to genes which have evolved independently by convergent evolution mechanism and have the same function. Homologues genes are originated from a common ancestor but can or not have the same function. Resistance candidate genes is a term used in a more general way, for example in positional cloning, fine mapping or expression profiling approaches but it is not necessarily specific to sequences, identified by amplification by means of degenerate primers designed from R-genes.

Taking into account that resistance genes have a conserved function even in very different species and remarkable similarity in the NBS domain, a phylogenetic approach to analysis of RGH genes is justified. However, because of their highly duplicated nature and existence as complex and clustered gene families phylogeny must carefully distinguish orthologous and paralogous sequences. Phylogenetic analyses of this kind of sequences from different plant species strongly suggest that these genes/sequences existed in plant genomes prior to divergence of related species (Michelmore and Meyers, 1998).

Many RGHs have been isolated in legumes species including common bean, alfalfa (*Medicago truncatula*), common bean, cowpea (*Vigna unguiculata*), chickpea (*Cicer arietinum*), lentil (*Lens culinaris*), pea (*Pisum sativum*), peanut (*Arachis hypogaea*) and soybean (*Glycine max*) (Kanazin et al., 1996; Yu et al., 1996; Creusot et al., 1999; Rivkin et al., 1999; Cannon et al., 2002; Bertoli et al., 2003; Yaish et al., 2004). In the genome of model legume *Medicago truncatula*, between 400 to 500 NBS-LRR resistance genes have been identified (Ameline-Torregrosa et al., 2008). *Medicago* RGH sequences can be useful for the development of degenerate primers for RGH isolation in other legumes (Rosen et al. unpublished).

In common bean, PCR-based R-gene analog polymorphism (RGAP) markers were developed from the conserved kinase-1a (GVGKTT) and hydrophobic domains (GLPLAL) of known NBS-LRR type R-genes and from EST databases (Rivkin et al., 1999). In that study, 32 RGAP markers were mapped in the BAT 93/Jalo EEP558 mapping population,

some of which were in the vicinity of known *R*-genes or QTL that provided resistance to different diseases such as rust, common bacterial blight (CBB), anthracnose, bacterial brown spot (BBS), web blight (WB), white mold (WM) angular leaf spot, halo bacterial blight and fusarium wilt (Miklas et al., 2006). In previous research common bean RGA amplicons derived from NBS and TIR domains were evaluated and eight classes of RGAs were mapped in genomic regions containing QTL associated with resistance to anthracnose, angular leaf spot (ALS), and *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV). (López et al., 2003). Finally, the gene expression of some RGA in common bean has also been studied (Ferrier-Cana et al., 2003). Liu et al. (2012), through a mining-data approach evaluated 176,011 sequences belonging to 454 derived sequences and ESTs sequences. A database of 50 *R* genes was used to perform a tBLASTn with the described sequences. A total of 365 unique sequences were identified and named PvRGLs (Resistance Genes Like of *Phaseolus vulgaris*). The expression of 24 of selected PvRGLs was confirmed through RT-PCR method. The large number of co-localization observed between RGAs and quantitative trait loci (QTL) linked to resistance in other species (McIntyre et al., 2005) suggests that the further mapping of RGA sequences will be useful in common bean.

The objective of the present study was to identify sequence NBS diversity in common bean using degenerate primers derived from *M. truncatula* RGHs, which were amplified in the Andean genotype G19833 that has been used for a shotgun-sequencing and genome annotation project and it is desirable to make comparative studies with other species from the *Phaseolus* genus or from the legume family (Gepts et al., 2008). A considerable number of degenerate primers (over 500) were evaluated, making it the most comprehensive study to date in putative sequences that encode TIR and non-TIR proteins in common bean. A phylogenetic analysis and characterization of these sequences is carried out and discussed.

2.1 Materials and methods

2.1.1 Plant materials and DNA extraction

This study was carried out with the genotype G19833, which is a Peruvian landrace from the Andean genepool with large yellow with red mottled seed and resistance to various

fungal pathogens (López et al., 2003), that has been chosen for whole genome sequencing and annotation for the common bean genome. G19833 is a parent of a central mapping population that has been used to place SSR and SNP based markers across the bean genome (Blair et al., 2008; Galeano et al., 2009, 2011). In addition to having expressed sequence tags (ESTs) from cDNA libraries (Ramírez et al., 2005), BAC libraries are available for this genotype (Blair et al. unpublished) which have been used for physical map construction (Schlueter et al., 2008) and for BAC end sequencing in the whole genome sequencing project. Genomic DNA from young leaves of this genotype was extracted using the cetyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) method as previously described (Dellaporta et al., 1983; Vallejos et al., 1992), for common bean DNA purification.

2.2 RGH sequences amplification

Amplification of candidates RGAs was carried out using degenerate primers designed at University of California – Davis (UCD), based on conserved sequences in the P-loop and GLPL motifs of the NBS domain of RGH sequences based on confirmed and well characterized R-genes from *Medicago truncatula* (S. Steiner per.comm.). A total of 49 degenerate primers were used: 24 designed from conserved TIR-type sequences (8 forward and 16 reverse) and 25 primers derived from conserved non-TIR type sequences (9 forward and 16 reverse). In total, 40.8% of the primers were degenerate by a factor of 192 fold while only 22.4% were 96 fold degenerate. The remaining 36.8% were 72, 128, 256, 288 and 512 fold degenerate. All 544 posible primer combinations between the forward and reverse primers were used for PCR reactions (Table 2-1). Annex 2-1 shows the sequences corresponding to the reverse and forward degenerate primers used in this study.

Each polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a final volume of 20 µl, using an *Ex Taq* enzyme kit for amplification (Takara Bio Inc, Japan). PCR reaction mix contained 40 ng of genomic template DNA, 0.15 U of *ExTaq* polymerase (5 U/µl), 1.25X of 10x *Ex Taq* Buffer (20mM Mg²⁺ plus), 0.2 mM of *ExTaq* dNTPs and 0.10 µM of each primer combination. Amplification was carried out in a Tetrad 2 DNA Engine Thermocycler (M.J. Research, Bio-Rad Laboratories), programmed for an initial cycle of 95°C for 3 min and

50 °C for 3 min, 72 °C for 3 min, followed by 29 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension step of 72°C for 5 min. Amplicons were separated on 1.0% agarose gels run in tris-borate-EDTA (TBE) buffer and visualized by ethidium bromide staining.

Table 2- 1.Primer combinations used to amplify bean RGHS.

Type of primer	Primer direction	Primer series	Total primers	Primer combinations	Total primer combinations
TIR	Reverse	TIR-R	16	TIR-F + TIR-R	128
	Forward	TIR-F	8	TIR-F + non-TIR-R	128
non-TIR	Reverse	non-TIR-R	16	non-TIR-F + TIR-R	144
	Forward	non-TIR-F	9	non-TIR-F + non-TIR-R	144
Total primer evaluated					544

2.3 Cloning and sequencing

PCR products between 400 pb and 700pb were selected for cloning which was carried out with the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA). Ligation reactions were carried out by mixing 2 µl of PCR product, 0.5µl of the pCR 4- TOPO cloning vector, and 0.5 µl of a salt solution. These reagents were incubated for 30 minutes at room temperature. TOP10 competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen, USA) were transformed using 2 µl of the ligation product and 37.5 µl of CBB80 medium. After 30 minutes on ice, cell transformation was carried out by heat shock at 42°C for 30 s and subsequently chilled on ice. The transformation mix was added to 250 µl of SOC medium, and transferred to a shaker incubator for 1 hour at 225 revolutions per minute. Finally, 250 µl of new SOC medium were added and the transformed cells were plated onto 200 ul of Luria broth agar containing 50 mg kanamycin/L. The plates were then incubated at 37°C for 24 hours before colony picking was carried out with a *Q-Bot*[™] (Genetix System, Inc.) robot.

A total of 192 colonies were picked for each primer pair. These were maintained in 384-well plates in a freezing-medium containing kanamycin (50ug/ml) incubated at 37°C for 24 h and then frozen at -80 °C. Plasmid DNA from 12 clones per primer pair, were extracted using a Wizard[®] SV 96 Plasmid DNA Purification System DNA and sent for sequencing. The obtained sequences revealed the primer combinacions with one or more positive clones for RGH fragments and these were chosen for deeper sequencing of 24 additional

clones. All DNA sequencing was performed at the College of Agricultural & Environmental Sciences Genomics Facility (CGF) (University California-Davis, USA), on an automated ABI 3730 XL capillary sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). The M13 forward primer was used in all unidirectional sequencing reactions. Sequences were trimmed with Seq Trim so that only insert sequences were analysed.

2.4 Phylogenetic analysis

Hidden-Markov model analyses were conducted with BioJava, to identify vector contamination versus RGH sequences. Trimmed sequences were compared with an NCGR database of *M. truncatula* RGH and R-genes sequences, in order to identify R-gene homologues and to classify them into TIR or non-TIR subsets. This sequence analysis was performed at the National Center of Genomics Resources (NCGR), using the algorithm Blastx and a cutoff threshold of e^{-10} . Finally, ORF prediction was used to determine the correct open reading frame of the sequence and then the gene sequences were trimmed to complete codons. R-gene sequences were then aligned with MAFFT software (Auto option) (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) with subsequent visual adjustment and editing in Jalview (<http://www.jalview.org>). The Phylip/Phylip4 sequence formats were then obtained using Readseq (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/readseq.cgi>). Phylogenetic analyses were conducted with the maximum likelihood (ML) method specifically using the RAxML (randomized accelerated maximum likelihood) protocol. Computations were performed on the computer cluster of the Cyber-Infrastructure for Phylogenetic RESearch project (CIPRES, www.phylo.org). The parameters were maintained at default settings with analyses conducted at the nucleotide and amino acid levels. The program Fig Tree was used to import and draw trees from Newick format files (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Phylogenetic analyses were carried out in two phases: first, considering only RGH sequences for common bean obtained in this work and; and second, considering RGH (NBS containing since P-loop to GLPL) sequences previously reported for common bean or other legume and plant species. In order to include all of the RGH sequences published for *Phaseolus vulgaris*, an exhaustive search was conducted through the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md.). The terms used were: NBS-LRR disease resistance-like protein, TIR-like putative resistance protein,

putative resistance protein (RGA) gene, NBS-LRR like putative resistance protein, resistance - like protein, NBS-LRR type putative disease resistance protein, resistance protein analog and disease resistance protein-like gene.

Cloned R genes from other legumes corresponding to NBS-LRR type RGA sequences reported in lentil (*Lens culinaris*) (Yaish et al., 2004); *Medicago truncatula* (Zhu et al., 2002) and faba bean (*Vicia faba*) and chickpea (*Cicer arietinum*) (Palomino et al. 2006) were included (Annex 2-2). Sequences related to fully characterized resistance proteins from non-legume plants species were included in a further analysis: *RPS4* (AJ243468), *RPP1* (AF098962), *RPM1* (X87851), *RPP13* (AF209730), and *RPP8* (AF089711) from *Arabidopsis*; *L6* (LUU27081) from *Linum utilissimum* L.; *N* (NGU15605) from *Nicotiana tabacum* L.; *I2* (AF004878) from *Solanum lycopersicon* L.; *Xa1* (AB002266) from *Oryza sativa* L.; and *Rp1* (AF107293) from *Zea mays* L. The *RPS2* sequence (EF560565.1) from *Arabidopsis thaliana* ecotype Ws-2, was used to root the phylogenetic tree made with common bean RGH sequences obtained in this work. Meanwhile, a mammalian sequence, APAF-1, was chosen to root the global phylogenetic tree.

Pairwise sequence alignments from representative sequences within the same family were made, in order to evaluate the synonymous (Ks) and non-synonymous (Ka) amino acid substitutions and to calculate the Ks/Ka value ω using the program Codeml that is part of the PAML software (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>). In order to confirm the ω values, the same ratio was calculated using another software package, DNAsp (<http://www.ub.edu/dnasp/>) (Librado and Rozas, 2009). Additionally, the MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) tool was used to discover conserved NBS motifs in amino acid sequences from TIR and non-TIR families (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>). Motif probabilities were based on residues appearing at each possible position and were displayed in a graphic manner as “sequence LOGOS”.

2.5 Results

2.5.1 Amplification of common bean RGH sequences

A total of 544 primer combinations based on 49 degenerate RGH oligonucleotide sequences were used to amplify common bean RGH sequences for this study. The

amplifications generally showed band sizes between 50 and 3000 bp in length. However, since the genomic region between the P-loop and GPLP of NBS-LRR type R-genes in *M. truncatula* is between 400 and 700 bp in length, we cloned and sequenced RGH fragments of approximate this size. In order to ensure the identification of the highest numbers of putative RGHs, a two step strategy was used: in the first step we sequenced twelve colonies from each primer combination. After this initial sequencing, the primer combinations that amplified one or more confirmed RGH sequences were chosen for deeper sequencing of an additional 24 colonies. Overall, in the initial screening, 228 primer combinations (42%) produced amplicons with RGH sequences based on sequencing of a total of 2.736 clones (twelve clones per primer combination). BlastX of the trimmed sequences against the NCGR database of *Medicago truncatula* R-genes was used to identify resistance gene homologues and to classify them into TIR or non-TIR families. This analysis allowed us to identify 155 sequences with conserved motifs that encoded NBS-type proteins from R-genes. This was equivalent to 5.7% of the total sequenced fragments. The positive sequences were obtained with 73 different primer combinations, corresponding to 13.6% of the 544 combinations evaluated.

In deep sequencing of the positive primer combinations, a total of 4486 clones were sequenced of which 1.317 failed to sequence well and some of the remaining clones were eliminated because they showed homology with transposons and retrotransposons by BLASTN searches. The analysis of the remaining sequences showed 403 clones (9.0%) with homology to NBS-LRR domains of known R-genes or RGH sequences cloned from *Medicago truncatula*. The corresponding 403 NBS-containing amino acid sequences were screened for motifs characteristic of resistance RGH proteins and the sequences were then classified as TIR or non-TIR type putative R-genes. Nearly half (47.9 %) of the NBS sequences were of the TIR class corresponding to 193 sequences, with slightly more (52.1%) sequences being of the non-TIR class corresponding to 210 sequences (Table 2-2.).

Open reading frame (ORF) prediction was used to determine the correct codons of each putative R-gene and sequences were trimmed to correspond to complete codons. A total of 158 TIR and 153 non-TIR sequences showed un-interrupted ORFs and were considered as RGH genes. The remaining sequences were not included in the

phylogenetic analysis because they contained early stop codons and/or frame-shift mutations and were considered to be pseudogenes or PCR errors. The average size of the trimmed and selected RGH sequences was 462 nt (with a range between 100 and 517 nt). The shortest sequences from 100 to 370 nt were eliminated (one to TIR and 11 to non-TIR), and as a result the remaining sequences varied from 406 to 517 nt. Redundant sequences were also eliminated using a nucleotide identity threshold value of 99%, where 56 TIR type sequences and 57 non-TIR type sequences were discarded.

Table 2- 2. Summary of the total common bean RGH and unique sequences with the amount of genes and pseudogenes distinguished among unique sequences.

R-gene class	ORF containing	non ORF containing	Total sequences	Unique sequences		
				ORF	no ORF	Total
				containing	containing	
TIR	158	35	193	105	33	138
non-TIR	153	57	210	116	48	164
Total	311	92	403	221	81	302

2.5.2 Success rate of various primer combinations

A comparison of the sequence results and the primer combination used showed that the class of RGH genes identified did not exhibit an association with the primer combinations used. For example, primer combinations TIR+TIR, which are primers designed only from TIR sequences, amplified TIR type RGH but also non-TIR type RGH sequences. Likewise, primer combinations non-TIR + non-TIR detected both TIR type and non-TIR type RGH genes. The number of RGH sequences identified with the 74 primer combinations ranged from 1 to 15, with an average of 5 amplicons per primer combination (Table 2-3).

Most of the identified RGH were amplified by 34 non-TIR + non-TIR primer pairs (182 sequences, corresponding to 46%), followed by 24 TIR + non-TIR primer pairs (141 sequences, corresponding to 32%). The other combination classes of TIR + TIR and non-TIR + TIR produced almost the same amount of RGH sequences (12%, and 9.5%,

respectively). Some primer combination amplified both TIR and non-TIR sequences together. However, the non-TIR + TIR combination did not show this pattern. It was notable that TIR + TIR combination produce a mix of TIR and non-TIR sequences. . In summary, the percentages of RGH sequences generated by each primer combination were variable, although the number of primers and their combinations were all very similar (16 reverse primers for TIR and non-TIR, 8 forward primers for TIR and 9 forward primers for non-TIR). Finally, the primer combinations produced variable numbers of appropriately sized fragments ranging from 39 to 69 for each.

Table 2- 3. Number of RGH amplified by different types of primer combinations.

Primer combinations (Forward+Reverse)	No. of primer combination evaluated	No. of primer combination that amplified fragments between 400-700 pb	No of primer combinations that amplified RGH					Final No. of RGH	%
			non- TIR	TIR and non-TIR	TIR	Total	(%)		
TIR + TIR	128	51	0	4	5	9	12.0	44	11
TIR + non-TIR	128	69	6	4	14	24	32.0	141	35
non-TIR + TIR	144	39	2	0	5	7	9.5	36	9
non-TIR + non-TIR	144	69	6	4	24	34	46.0	182	45
	544	228	14	12	48	74		403	

2.5.3 Phylogeny of newly-discovered common bean RGH sequences

Phylogenetic analyses were performed to the common segments from the NBS regions. Multiple alignments of 105 TIR and 116 non-TIR sequences showed nucleotide identity values from up to 99% and allowed us to group those sequences sharing 90% nucleotide identity. The number of sequences per group ranged from 1 to 21 for TIR sequences and from 1 to 25 for non-TIR sequences. For each group, one sequence with the highest similarity values with the other sequences was chosen as a representative sequence to use in the phylogenetic analysis.

After consolidating the dataset of the representative RGH sequences, 53 sequences were included in the phylogenetic tree, 28 were TIR type (Annex 2-3) and 26 were non-TIR type (Annex 2-4). These sequences were uploaded to GenBank with the accession numbers JQ313582-JQ313634. Because the phylogenetic tree obtained with nucleotides and with

deduced amino acid sequences had similar topologies, only the amino acid results are shown (Figure 2-1). In any case, topologies based on nucleotide generally agree with those of proteins confirming the reliability of either analysis.

After an initial phylogenetical analysis, three sequences (JQ313603, JQ313604 and JQ313605) were eliminated because of their distance from the main branches of the tree. Three main clusters were evident for each family of RGH sequences (TIR and non-TIR). These clusters grouped a total of 14 clades of TIR sequences defined as Clade 1 to Clade 14 and 7 clades of non-TIR sequences defined as Clade 15 to Clade 21. Ten of these clades, 7 for TIR genes and 3 for non-TIR genes had only a single representative sequence each, showing that they were unique clades and that a diversity of RGH sequences exists in common bean. The phylogenetic tree showed TIR and non-TIR subfamilies as two major branches with high bootstrap values of 94% and 86%, respectively. The NBS domain of RPS2 from *A. thaliana* was a useful outgroup for anchoring the common bean TIR and non-TIR groups. It was notably that *P. vulgaris* sequences were more similar amongst each other than with the RPS2 gene sequence.

Apart from the phylogenetic analysis, differentiation between TIR and non-TIR sequences was also evident in the Kin-2 and Kin-3 conserved motifs that are part of the NBS domain. The deduced amino acid sequence differences between 105 TIR-NBS and 116 non-TIR-NBS proteins are shown in Figure 2-2. All non-TIR amino acid sequences had a characteristic tryptophan residue (W); while TIR homologous sequences were more variable with aspartic acid (D), asparagine (N), serine (S), proline (P) or threonine (T) residues at the final amino-acid position of the Kin2 motif. Relative entropy of these motifs are shown in the logos found in Figure 2-2. Apart from the Kinase motifs, the deduced TIR-NBS proteins exhibited a highly conservative sequence of SLEL[FL]SWHAF at the C-terminus (amino acids 159 to 168). Meanwhile, most of the non-TIR-NBS sequences exhibited the consensus sequence WVC[VI]SD[DH]F at the N-terminus (amino acids 32 to 39). Presence of these sequences is characteristic of NBS-LRR disease resistance proteins. The highest-scoring hits were for RGAs from *P. vulgaris* and *Helianthus annuus* (data not shown), using the Motif Alignment and Search Tools (Bailey and Gribskov, 1998).

2.5.4 Ratio of non-synonymous to synonymous nucleotide substitutions.

Pairwise sequence alignments from representative sequences within the same family were made, in order to evaluate the synonymous (Ks) and non-synonymous (Ka) nucleotide substitutions and to calculate the Ks/Ka value ω (Yang, 2007). The Ka/Ks ratio ranged from 0.18 to 1.25 for TIR families and from 0.29 to 0.40 for non-TIR clades. The average value ω to each clade is shown in the phylogenetic tree (Figure 2.1). The results obtained through PAML and DNAsp programs were highly similar (Annex 2.5).

Purifying selection was found for TIR and non-TIR clades where Ka/Ks values ranged from 0.18 to 0.47. In these cases where the clades had Ka/Ks values significantly lower than 1.0 purifying selection was predicted. While diversifying selection was identified in sequences belonging to the T11 and T13 clades where the average ratio was higher than one. Some pairwise comparison inside the clade 10, had values higher than one. However, the average value was near 1.0, which could be explained as neutral selection for the majority of the sequences in this cluster.

Figure 2- 1. Phylogenetic tree of *Phaseolus vulgaris* RGH sequences constructed with RAxML and using RPS2 from *Arabidopsis thaliana* to root the tree.

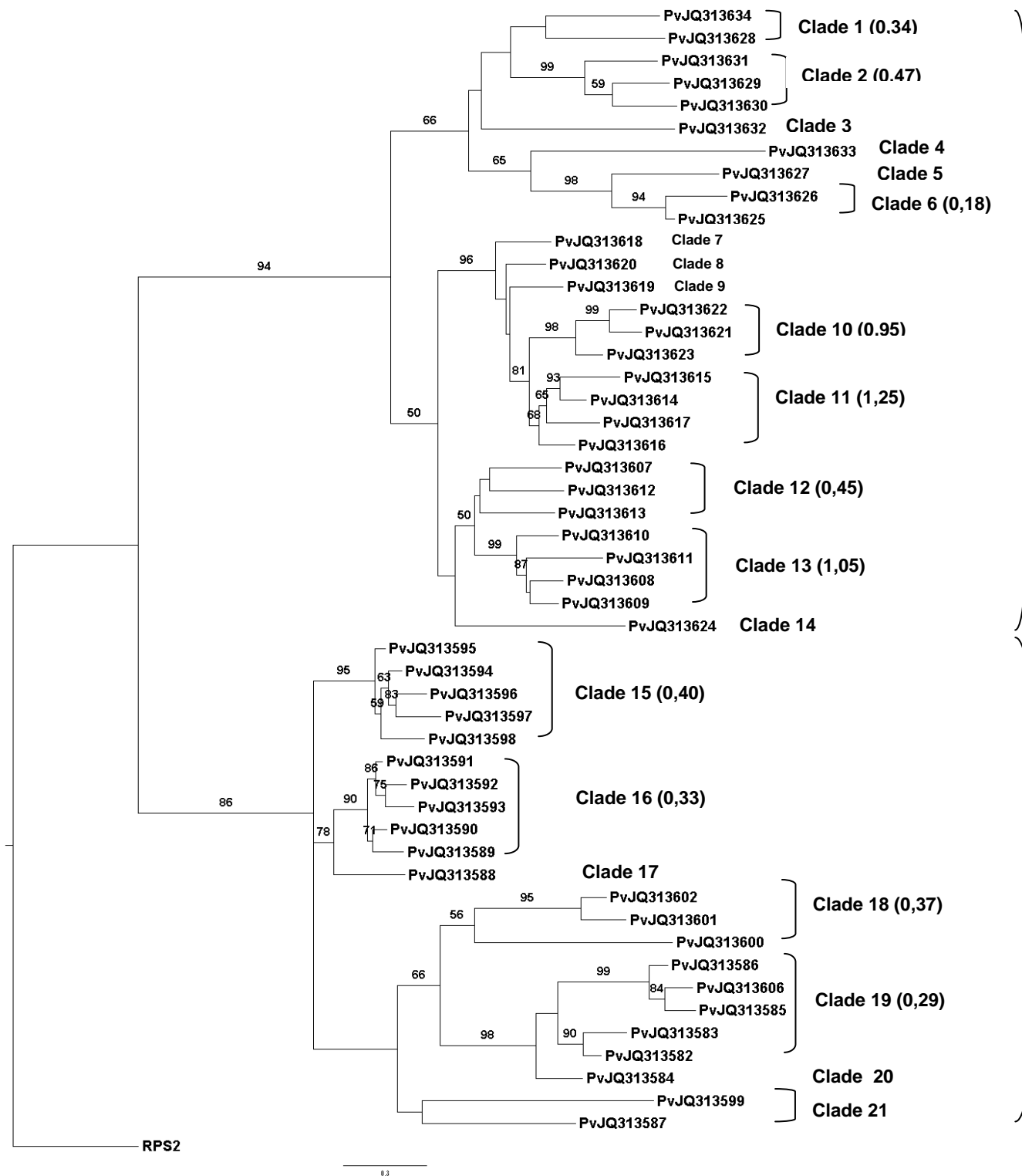
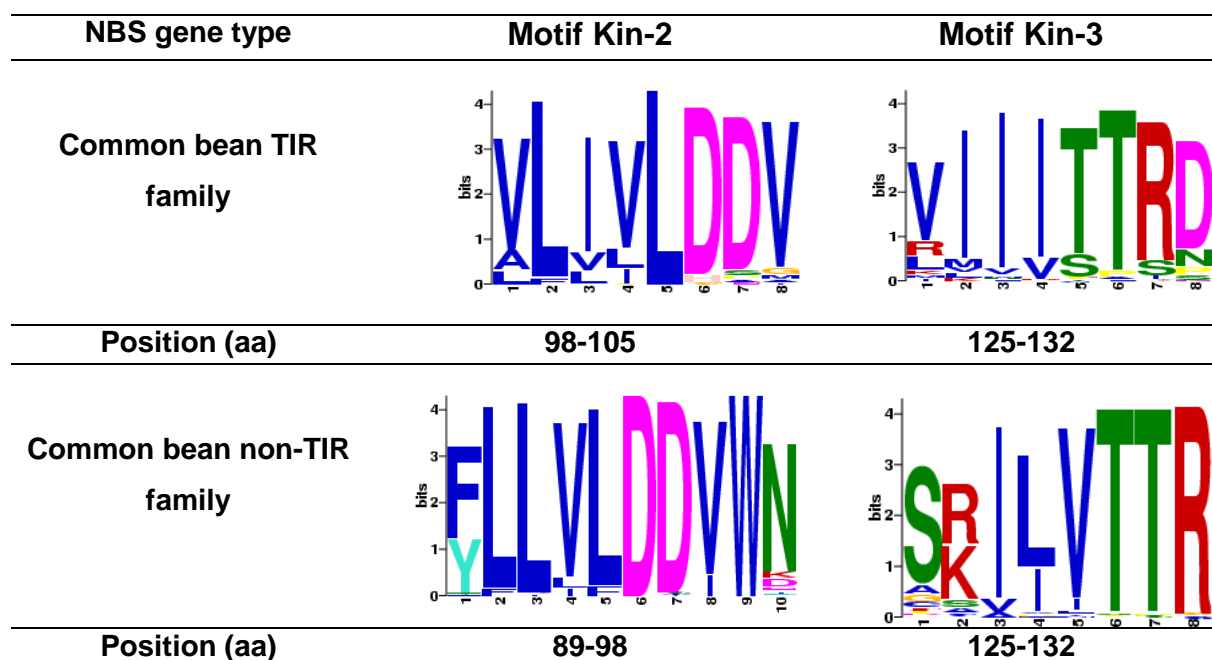


Figure 2- 2. Amino acid sequence logos.

Relative entropy of conserved positions for Kin-2 (left half) and Kin-3 (right half) motifs across 105 TIR and 116 non-TIR NBS-LRR sequences is shown. Amino acids are color coded according to their biochemical properties as hydrophobic (blue), polar/non-aliphatic (green), acidic (magenta), and positively charged (red) residues. Numbers below sequence logo indicate residue positions.



2.5.5 Phylogenetic analysis with other legumes and non-legumes

RGH

A total of 67 common bean sequences with similarity to NBS-LRR genes were found in GenBank and were included in a second phylogenetic analysis. These were classified into 27 Andean sequences from the genotypes G19833, JaloEEP558 and Sprite; and 22 Mesoamerican sequences from the genotypes BAT93, DOR364 and Negro Jamapa. A further 9 sequences were found for Olathe and Sierra, also Mesoamerican beans but of race Durango. Seven sequences reported as RGA markers from a Mesoamerican genotype (Hanai et al., 2010) were also included and two more common bean sequences (AF098970.1, and AF098971.1) without genotype information were incorporated. A complete description of all of these sequences is found in Table 2-4.

Table 2- 4. Description of resistance genes from *Phaseolus vulgaris* included in the phylogenetic analysis, with GenBank nucleotide and protein identities (ID).

Genotype	ID nucleotide	ID protein	Gene pool	Description	Reference
Sprite	DQ002468.1	ABA00702.1	A	Disease resistance protein gene	(Vallejos et al., 2006)
Sprite	DQ002469.1	NA	A	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
Sprite	DQ002470.1	NA	A	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
Sprite	DQ002471.1	NA	A	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
Sprite	DQ002472.1	NA	A	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
Sprite	DQ002473.1	NA	A	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
Sprite	DQ002474.1	NA	A	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
Sprite	DQ002475.1	NA	A	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
BAT93	AF072167.1	AAC26762.1	MA	PRLB1 putative resistance protein (RGA) gene	(Geffroy et al., 1999)
BAT93	AF306499.1	AAK61315.1	MA	NBS-LRR resistance-like protein B8 (B8) mRNA	(Ferrier-Cana et al., 2003)
BAT93	AF306500.1	AAK61316.1	MA	NBS-LRR resistance-like protein b11 (b11) mRNA	(Ferrier-Cana et al., 2003)
BAT93	AF306503.1	AAK61319.1	MA	NBS-LRR resistance-like protein B8 (B8) gene	(Ferrier-Cana et al., 2003)
BAT93	AF306504.1	AAK61320.1	MA	NBS-LRR resistance-like protein b11 (b11) gene	(Ferrier-Cana et al., 2003)
BAT93	EU856769.1	ACJ22810.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B7 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856770.1	ACJ22811.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B8 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856771.1	ACJ22812.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-b11 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856772.1	ACJ22813.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B16 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856773.1	ACJ22814.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B17 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856774.1	ACJ22815.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B18 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856775.1	ACJ22816.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B19 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856776.1	ACJ22817.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B22 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856777.1	ACJ22818.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B23 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	EU856768.1	ACJ22809.1	MA	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-B3 gene	(Geffroy et al., 2009)
BAT93	AF143553.1	AAF81616.1	MA	Clone PRLB5 resistance protein analog gene	de Oliveira et al., unpublis

Genotype	ID nucleotide	ID protein	Gene pool	Description	Reference
G19833	AF084026.1	AAC33296.1	A	NBS type putative resistance protein gene	(López et al., 2003)
G19833	AF478170.1	AAO33123.1	A	NBS-like putative resistance protein (RGA2) gene	(López et al., 2003)
G19833	AF478171.1	AAO33124.1	A	NBS-like putative resistance protein (RGA3) gene	(López et al., 2003)
G19833	AF478173.1	AAO33126.1	A	NBS-like putative resistance protein (RGA5) gene	(López et al., 2003)
G19833	AF478175.1	AAO33128.1	A	NBS-like putative resistance protein (RGA7) gene	(López et al., 2003)
G19833	AF478176.1	AAO33129.1	A	NBS-like putative resistance protein (RGA8) gene	(López et al., 2003)
JaloEEP558	AF072168.1	AAC26763.1	A	Clone PRLJ1 putative resistance protein (RGA) gene	(Geffroy et al., 1999)
JaloEEP558	AF143551.1	AAF81615.1	A	Clone PRLJ4 resistance protein analog gene	de Oliveira et al., unpub
JaloEEP558	AF143556.1	AAF81617.1	A	Clone PRLJ2 resistance protein analog gene	de Oliveira et al., unpub
JaloEEP558	AF143557.1	AAF81618.1	A	Clone PRLJ3 resistance protein analog gene	de Oliveira et al., unpub
JaloEEP558	AF306501.1	AAK61317.1	A	NBS-LRR resistance-like protein J71 (J71) mRNA	(Ferrier-Cana et al., 2000)
JaloEEP558	AF306502.1	AAK61318.1	A	NBS-LRR resistance-like protein J78 (J78) mRNA	(Ferrier-Cana et al., 2000)
JaloEEP558	AF306505.1	AAK61321.1	A	NBS-LRR resistance-like protein J71 (J71) gene	(Ferrier-Cana et al., 2000)
JaloEEP558	AF306506.1	AAK61322.1	A	NBS-LRR resistance-like protein J78 (J78) gene	(Ferrier-Cana et al., 2000)
JaloEEP558	AY237123.1	AAO62728.1	A	NBS-LRR resistance-like protein (JA1tr) gene isoforms	(Ferrier-Cana et al., 2000)
JaloEEP558	EU856778.1	ACJ22819.1	A	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-J1 gene	(Geffroy et al., 2009)
JaloEEP558	EU856779.1	ACJ22820.1	A	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-J3 gene	(Geffroy et al., 2009)
JaloEEP558	EU856780.1	ACJ22821.1	A	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-J9 gene	(Geffroy et al., 2009)
JaloEEP558	EU856781.1	ACJ22822.1	A	NBS-LRR type putative disease resistance protein CNL-J5 gene	(Geffroy et al., 2009)

Continued....

Genotype	ID nucleotide	ID protein	Gene pool	Description	Reference
BAT93	AF143555.1	NA	MA	Clone PRLB2 resistance protein analog-like gene	de Oliveira et al., unpublished
BAT93	AF143554.1	NA	MA	Resistance protein analog-like gene	de Oliveira et al., unpublished
BAT93	AF143552.1	NA	MA	Clone PRLB4 resistance protein analog-like gene	de Oliveira et al., unpublished
DOR364	AF478174.1	AAO33127.1	MA	NBS-like putative resistance protein (RGA6) gene	(López et al., 2003)
DOR364	AF478172.1	AAO33125.1	MA	NBS-like putative resistance protein (RGA4) gene	(López et al., 2003)
Jamapa	DQ002476.1	NA	MA	Disease resistance protein-like gene	(Vallejos et al., 2006)
Olathe	AF363801.1	AAK50046.1	NA	Disease resistance protein OB3 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Olathe	AF363802.1	AAK50047.1	NA	Disease resistance protein OB5 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Olathe	AF363803.1	AAK50048.1	NA	Disease resistance protein OB8 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Olathe	AF363804.1	AAK50049.1	NA	Disease resistance protein OB9 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Sierra	AF363796.1	AAK50041.1	NA	Disease resistance protein SB1 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Sierra	AF363797.1	AAK50042.1	NA	Disease resistance protein SB3 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Sierra	AF363798.1	AAK50043.1	NA	Disease resistance protein SB4 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Sierra	AF363799.1	AAK50044.1	NA	Disease resistance protein SB5 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
Sierra	AF363800.1	AAK50045.1	NA	Disease resistance protein SB8 (RGA) gene	(Rivkin et al., 1999)
NA	AF098970.1	AAD13036.1	NA	NBS-LRR-like protein cD7 (CO-2) mRNA	(Creusot et al., 1999)
NA	AF098971.1	AAD13037.1	NA	NBS-LRR-like protein cD8 (CO-2) mRNA	Creusot et al., 1999)
NA	HM126538.1	NA	NA	RGA marker RNF330 genomic sequence	(Hanai et al., 2010)
NA	HM126539.1	NA	NA	RGA marker RNF356 genomic sequence	(Hanai et al., 2010)
NA	HM126540.1	NA	NA	RGA marker RNF475 genomic sequence	(Hanai et al., 2010)
NA	HM126541.1	NA	NA	RGA marker RRF380 genomic sequence	(Hanai et al., 2010)
NA	HM126542.1	NA	NA	RGA marker RRF410 genomic sequence	(Hanai et al., 2010)
NA	HM126543.1	NA	NA	RGA marker RKF310 genomic sequence	(Hanai et al., 2010)
NA	HM126544.1	NA	NA	RGA marker RKR240 genomic sequence	(Hanai et al., 2010)

Sequences from the Andean genotype JaloEEP558 (EU856787.1, EU856786.1, EU856785.1, EU856784.1, EU856783.1, EU856782.1) and from the Mesoamerican genotype BAT93 (EU856792.1, EU856791.1, EU856790.1, EU856789.1, EU856788.1), were not included in this analysis because they were cataloged as NBS-LRR disease resistance-like pseudogenes. Therefore, a total of 67 sequences obtained from GenBank were considered RGH genes comparable to the new sequences we had obtained. For species comparisons 123 RGA sequences from other legumes such as chickpea (25 sequences), faba bean (44 sequences), lentil (23 sequences), and *Medicago truncatula* (31 sequences) were also included along with resistance proteins from Arabidopsis (*RPS4*, *RPP1*, *RPM1*, *RPP13*, *RPP8*), corn (*RP1*), flax (*L6*), rice (*Xa-1*), tobacco (*N*) and tomato (*I2*).

The sequences described above were grouped into two new phylogenetic trees from TIR and non-TIR clades (Figure 2-3 and 2-4), considering only the NBS region without the P-loop and GLPL regions and using a nucleotide identity threshold of 90%. Based on this criterion only 12 of the 67 previously reported RGAs from common bean were included: EU856770.1, EU856776.1, AF072168.1, AF143553.1, AF363798.1, AF363804.1, AF478172.1, AF478173.1, AF478174.1, AF478175.1, AF478176.1 and AY237123.1. Similarly, only 43 of the legume sequences were used: 6 from chickpea, 5 from faba bean, 12 from lentil and 20 from medicago (Annex 2-2). Therefore, the new phylogenetic trees were constructed with 113 sequences in total including the 50 RGH sequences obtained in this work, 12 RGH or RGA sequences previously reported in common bean, 41 RGAs from other legumes, 10 resistance genes from other species and APAF1 as an outgroup sequence to root the tree.

Nucleotide sequences obtained from GenBank and RGH sequences isolated in this work had an average length of 480 bp encoding 155 amino acids. Although the sequence AF478171 was over 500 bp it showed less than 90% nucleotide identity to other sequences and was eliminated from the phylogenetic analysis. The RGHs obtained from common bean formed some defined clades and these RGHs were not clustered with the NBS domain of other plant species such as rice, flax, corn, tobacco and tomato. Common bean sequences were clustered with sequences from the *P. vulgaris* collected in GenBank regardless of the genotype. Other legume RGH sequences, were included along with common bean RGHs sequences in someclades, most being from *Medicago truncatula*, lentil, chickpea and faba bean RGHs were largely separate except in a few cases where they were clustered with common bean RGH sequences.

Figure 2- 3. Phylogenetic tree to common bean and other legumes and non-legumes RGH non-TIR sequences.

Relationships between the newly obtained common bean non-TIR RGH sequences and previous resistance genes downloaded from GenBank for common bean, other legumes or non-legumes plant species. The GenBank name ID is preceded by two letters indicating the specie: Ca: *Cicer arietinus*-purple colour, Mt: *Medicago truncatula*-green colour, Pv: *Phaseolus vulgaris*-black colour for the sequences obtained in this work, and blue colour for sequences obtained from GenBank, Vf: *Vicia faba*-orange colour.

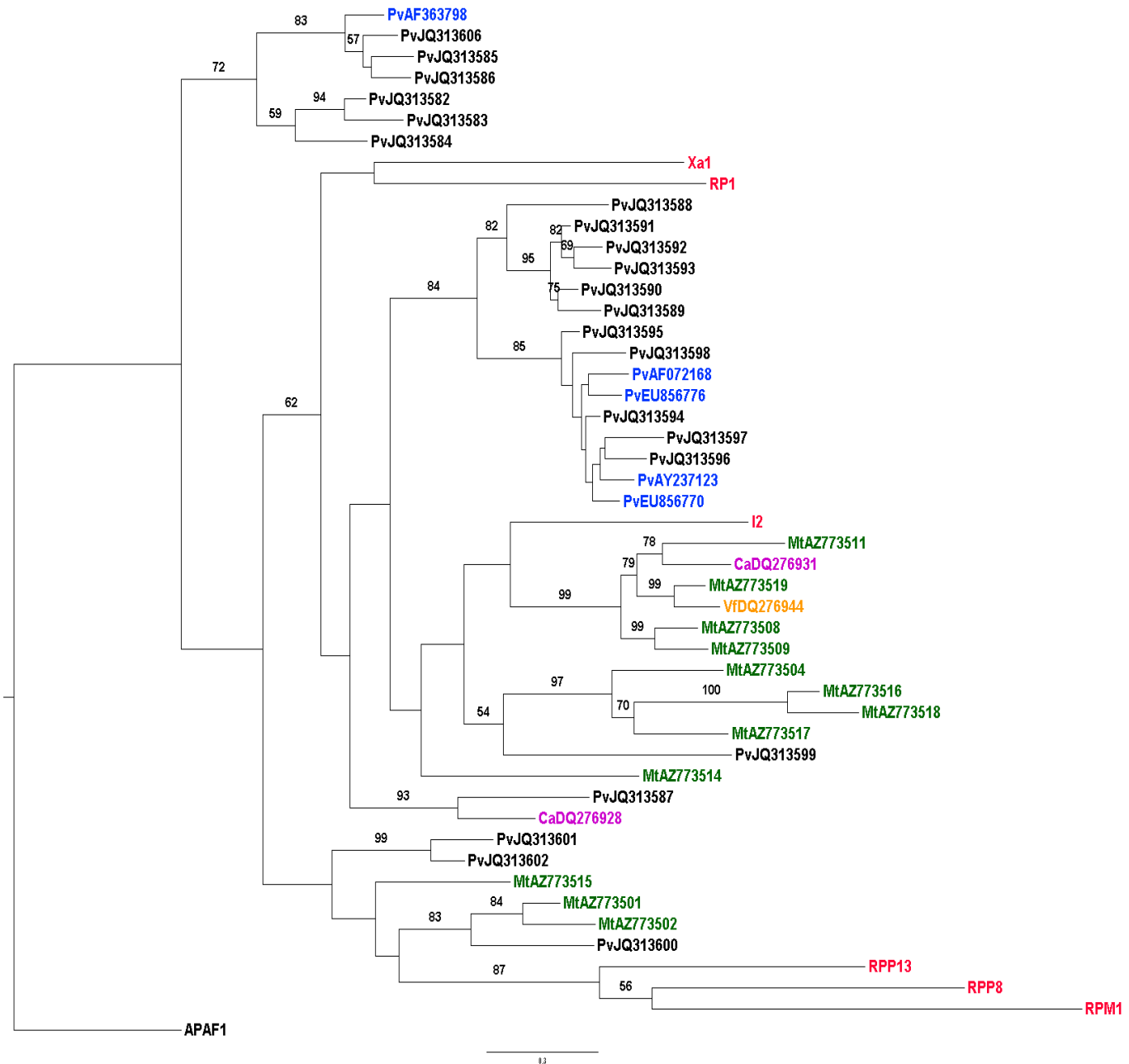
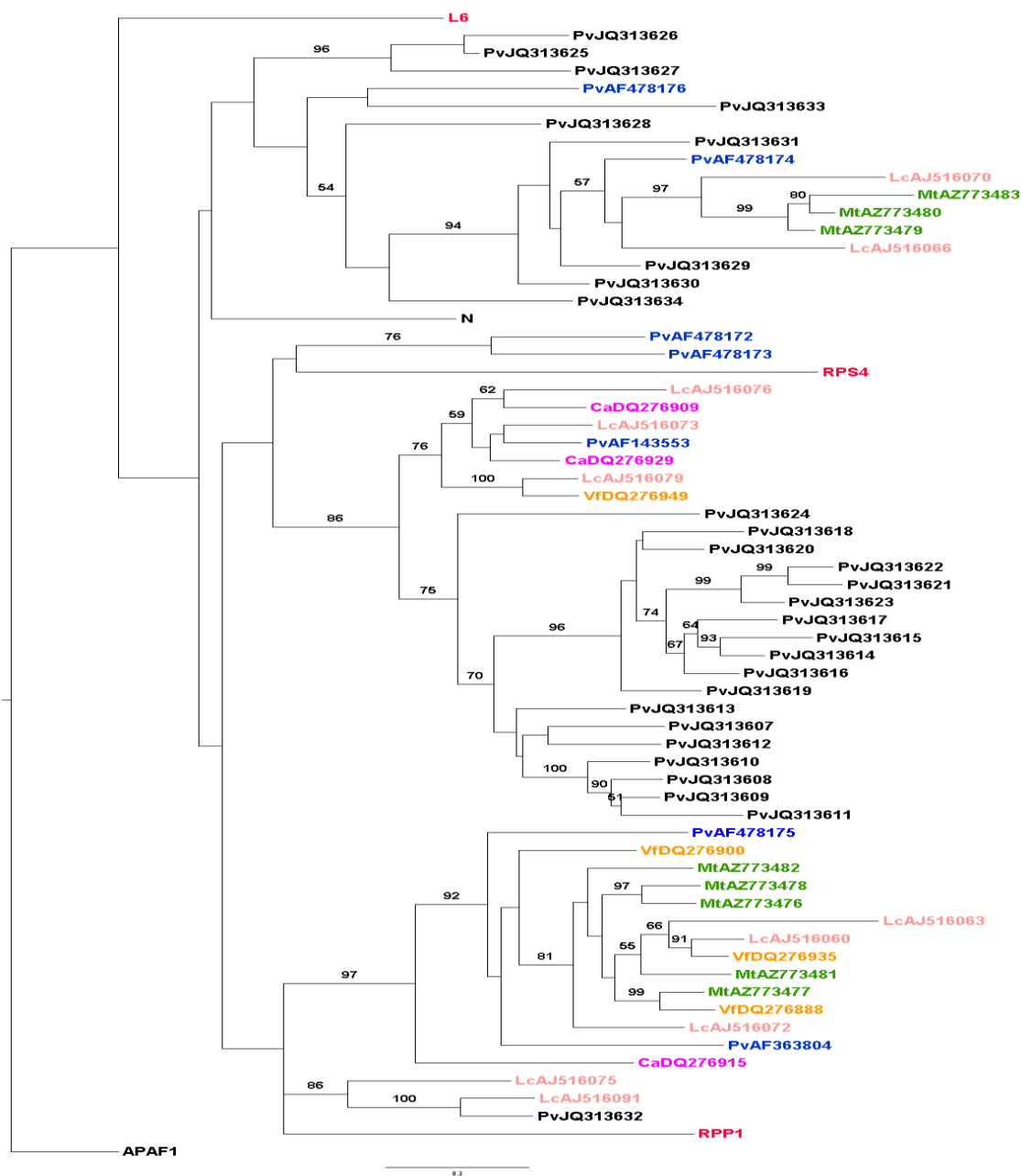


Figure 2- 4. Phylogenetic tree to common bean and other legumes and non-legumes RGH TIR sequences

Relationships between the newly obtained common bean RGH sequences and previous TIR RGH sequences downloaded from GenBank for common bean, other legumes or non-legumes plant species. The GenBank name ID is preceded by two letters indicating the specie: Ca: *Cicer arietinus*-purple colour, Lc: *Lens culinaris* pink colour , Mt: *Medicago truncatula*-green colour, Pv: *Phaseolus vulgaris*-black colour for the sequences obtained in this work, and blue colour for sequences obtained from GenBank, Vf: *Vicia faba*-orange colour.



2.6 Discussion

A significant accomplishment of the present study was to obtain a large number of RGH sequences and to evaluate their similarity and relationships with each other or with other R-gene sequences from common bean. A total of 311 sequences were classified as successful RGH gene fragments based on having an un-interrupted open reading frame with high identity to R-genes from *M. truncatula*, containing conserved motifs of NBS-LRR type genes such as Kin-2 or Kin-3.

A total of 74 primer combinations were efficient for amplifying RGH sequences from common bean. Of these 13 amplified exclusively TIR sequences, 13 only non-TIR sequences and the remaining 48 primer combinations amplified TIR and non-TIR sequences. Therefore, cross-reaction of TIR and non-TIR primers producing both TIR and non-TIR genes was observed. This means that the family or the type of RGH sequence detected was largely independent of the primer combination used. Furthermore, the amplification of TIR or non-TIR sequences appear to be more related to the plant species than to primer specificity, and many primer combinations can amplify TIR sequences in one species or non-TIR sequences in a different species.

These results are not surprising, because both TIR and non-TIR genes contain conserved sequences at the P-loop and GLPL motifs. For example, one set of primers from soybean known to amplify TIR type sequences in this species only identified non-TIR sequences when used heterologously in *Brassica oleracea* (Kanazin et al., 1996). Studies in *Arachis* and soybean (*Glycine max* L.) have found that primers derived from P-loop and GLPL motifs appear to preferentially amplify TIR type genes rather than non-TIR type genes (Yu et al., 1996; Bertoli et al., 2003). Similarly, an association between the primer combination and the type of amplified sequence has been suggested in lentil (Yaish et al., 2004). Meanwhile for a monocotyledonous plant, Zingiber, primers that previously amplified TIR and non-TIR sequences only obtained non-TIR NBS-LRR sequences (Priya and Subramanian, 2008).

Primer design is considered an important factor which determines the success in amplification of the target products especially in the case of variable RGH sequence. The primer length, the nucleotide composition, and the position and number of degeneracy nucleotide within each primer as well as the prevalence of putative targets in the analyzed genomes analysed are factors that determined the amount of RGH amplification (Azhar and Heslop-Harrison, 2008; Miller et al., 2008). In this study, an important experimental strategy for increasing the number of common bean RGH sequences was the low level of degeneracy in most of the primer combinations, as was recommended by previous results (Shen et al., 1998).

The NBS-LRR class of resistance genes has been shown to be a very large and variable gene family among plant species. For example in *Arabidopsis thaliana* (145 Mb/1C), approximately 200 genes encoding NBS related motifs are estimated to occur in the genome (Meyers et al., 1999). Other plant species with more complex or larger genomes correspondingly can have more NBS-LRR genes. For example, it has been predicted 386 NBS encoding genes in a red raspberry study (280 Mbp/1C) (Samuelian, et al., (2008); however, they only identified 75 genomic fragments with intermediate similarity to actual NBS-LRR genes. Therefore, successful RGH cloning is a numbers game.

Based on calculations with *Arabidopsis*, common bean with a genome size of 450-650 Mbp/1C, should have up to 850 NBS encoding genes. However, in this study we only obtained 403 RGH sequences and if we include 67 other independent previously cloned NBS-LRR sequences the number of RGH would still be below that expected amount. In a common bean research in 1.69 million of 454 derived sequences and 116.716 ESTs a total of 365 RGLs were found, most of them belonging to NBS-LRR, LRR and PK classes (Liu et al., 2012). This may be because the number of RGH sequences in medium sized genomes may not be predictable based on *Arabidopsis* which is an ancestral polyploidy.

Some examples that show the difference among the number of RGHs in different fully sequenced plant genomes are: *Populus trichocarpa* (550 Mb) with 400 RGH genes (Kohler et al., 2008), *Medicago truncatula* (500 Mb) with 400 (Meyers et al., 2003) and *Oryza sativa* (430 Mb) with 600 (Monosi et al., 2004). These results could indicate that the number of RGHs is not proportional with the genome size and that in some species the

RGH number can be either lower or higher than expected. As a result a deeper study will need to be conducted with the whole genome sequence of G19833 to determine if our cloning efforts obtained almost the complete set of RGH genes found in common bean. Apart from the number of RGH genes found in a given species, the ratio of the TIR and non-TIR type sequences has been variable among different plants. In *Arabidopsis* the ratio has been 2:1 (Meyers et al., 2003), in peanut (*Arachis hypogaea* L.) it was 3:1 (Radwan et al., 2008) and in hop (*Humulus lupulus* L.) this ratio was 1:2 (Kozjak et al., 2009). The difference is especially notable when comparing monocotyledonous versus dicotyledonous plant genomes, because in dicot species TIR sequences are common but in monocots they are almost completely missing (Pan et al., 2000b; Miller et al., 2008). In general, non-TIR sequences are more common and heterogeneous than TIR sequences (Miller et al., 2008), however our phylogenetic analysis for common bean revealed an almost equal number of clades in the TIR and non-TIR subfamilies of common bean RGH genes. More typical results were obtained in pear (*Pyrus* spp.), where 93 TIR resistance genes and only 5 non-TIR type were identified (Zhang et al., 2011). These results suggest that the number TIR genes is species-specific as a consequence of evolutionary processes such as gene-for-gene interaction with avirulence factors from specific plant-pathogens.

Phylogenetic tree showed a large number of clades corresponding to different RGH families for common bean, which reveals a high polymorphism of these genes in this specie. This diversity could be the adaptive response to the many selective pressures by different pathogens infecting common bean. While repeated sequences were not taken into account for the phylogenetic analysis we performed, given that they can create confusion in the construction of gene trees and increase the time of analysis (Hall, 2008), sequences exhibiting identity values near 90% were included as individual RGH genes. The most closely related sequences could be the result of recent duplication events from a common ancestral gene (Samuelian et al., 2008).

Our results showed that not all common bean RGHs contained a complete open read frame (ORF). Out of 403 sequences, one fourth exhibited stop codons or frame shift mutations, hence these sequences could be pseudogenes or partial sequences. Pseudogene identification in RGH studies has been important for various plant species.

For example in the *Musa* genus, 25% of RGH sequences were pseudogenes (Azhar and Heslop-Harrison, 2008). Dicotyledonous genomes contain a variable number of pseudogenes, ranging from 10% in tomato, *Solanum lycopersicum* L. (Pan et al., 2000a), to 50% in *Zingiber* spp. (Nair and Thomas, 2007) and *Pinus monticola* (Liu and Ekramoddoullah, 2003). Pseudogenes could be the result of high rates of recombination, point mutations and indels in RGH sequences as well as rearrangements by transposon that are often observed in R-gene families. All of this could be due to the rapid evolution of R-genes based on their tandem arrangement in certain parts of the genome (Ellis and Jones, 1998; Leister et al., 1998; Young, 2000). Pseudogenes might drive further evolution since they can be sources of sequences for recombination that allow gene conversion with functional R gene paralogs (Michelmore and Meyers, 1998).

Another evolutionarily important part of the NBS genes was based on several conserved domains. For example, the variability found within the Kinase-2 motif of the NBS containing genes in common bean might generate functional differences in the proteins these encode. While most TIR type NBS proteins have an aspartic acid (D) at the end of the Kin-2 domain and most non-TIR type NBS proteins have a tryptophan residue (W) (Meyers et al., 1999; Pan et al., 2000a) we found additional variability for this amino acid position.

The ratio between synonymous and non-synonymous mutations ($\omega = K_a/K_s$) is a good indicator of the type of selection acting on a specific coding region (Yang, 2007). The general values obtained for the common bean TIR and non-TIR gene comparisons ($\omega < 1$) reflected purifying selection. This type of selection is not surprising because the NBS domain is an important signaling component in plant defences activation and is highly conserved across different species and genus (Reddy et al., 2011). However, pairwise comparisons inside the clades 11 and 13, showed values higher than 1 ($\omega > 1$) indicating positive selection. Sequences undergoing positive selection deserve a more detailed analysis because they may encode functional changes that drive evolution of a specific taxonomic lineage. With genome-wide sequence data for legumes, a sliding-window calculation of K_a/K_s ratio can identify specific regions of the genome that have been strongly affected by selection (Choi and Lahn, 2003).

For previous studies in common bean RGH sequences, diversifying selection was found at the NBS domain of the candidate for BCMV resistance *I* gene, but not in the TIR domain of the same gene (Vallejos et al., 2006). Meanwhile, diversifying selection in the LRR domains was exhibited in four linked NBS-LRR genes associated with resistance to anthracnose in common bean (Ferrier-Cana et al., (2003). In our study the number of sequences analysed was larger producing more evidence that NBS domains are mainly subject to purifying selection. LRR domains meanwhile tend to be subject to diversifying selection as they directly interact with AVR factors that are constantly changing with pathogen evolution. In *P. vulgaris* a co-evolution process has been observed in the interaction with different pathogens such as *Colletotrichum lindemuthianum* (Geffroy et al., 1999), *Phaeoisariopsis griseola* (Guzman et al., 1995) and *Uromyces appendiculatus* (Sandlin et al., 1999). Therefore, it is important to undertake more detailed studies of NBS genes in common bean, including genotypes from the Andean and Mesoamerican gene pool, in order to establish the role of pathogen pressure on the evolution of NBS disease-resistance genes in this species.

The crop is one of the most ancient of the American cultigens and has been continuously exposed to pressure by different microorganism with the need to respond to new pathogen specificities. Plant defense strategies including effector triggered immunity along with several other types of resistance related proteins are important to understand for controlling disease in the crop. The RGH sequence obtained in the present work are a valuable source of molecular markers, which could be used to tag resistance genes of interest and then transfer them between genotypes by marker assisted selection. This would facilitate the generation of new breeding varieties and contribute to common bean improvement.

The relatively small size of the common bean genome and its low physical to genetic map distance makes this crop species a good candidate for the isolation of R genes via candidate gene techniques. The further exploration of RGH genes in common beans could be used to identify resistance genes in non-commercial genotypes, which may be introgressed into modern varieties through marker assisted selection. This is important in cases such as breeding for anthracnose resistance, where sources of resistance are known but some genes are uncharacterized or for Ascochyta blight resistance, where there are a

limited number of sources of resistance in the primary gene pool, and only secondary gene pool species are candidates for breeding to improve resistance. The spectrum of resistance offered by RGH sequences is wide across many species of plants and includes resistance to biotrophs or hemibiotrophs. Thus there are many opportunities to use the strategy of RGH selection and association with R-genes in common bean.

2.7 List of annex

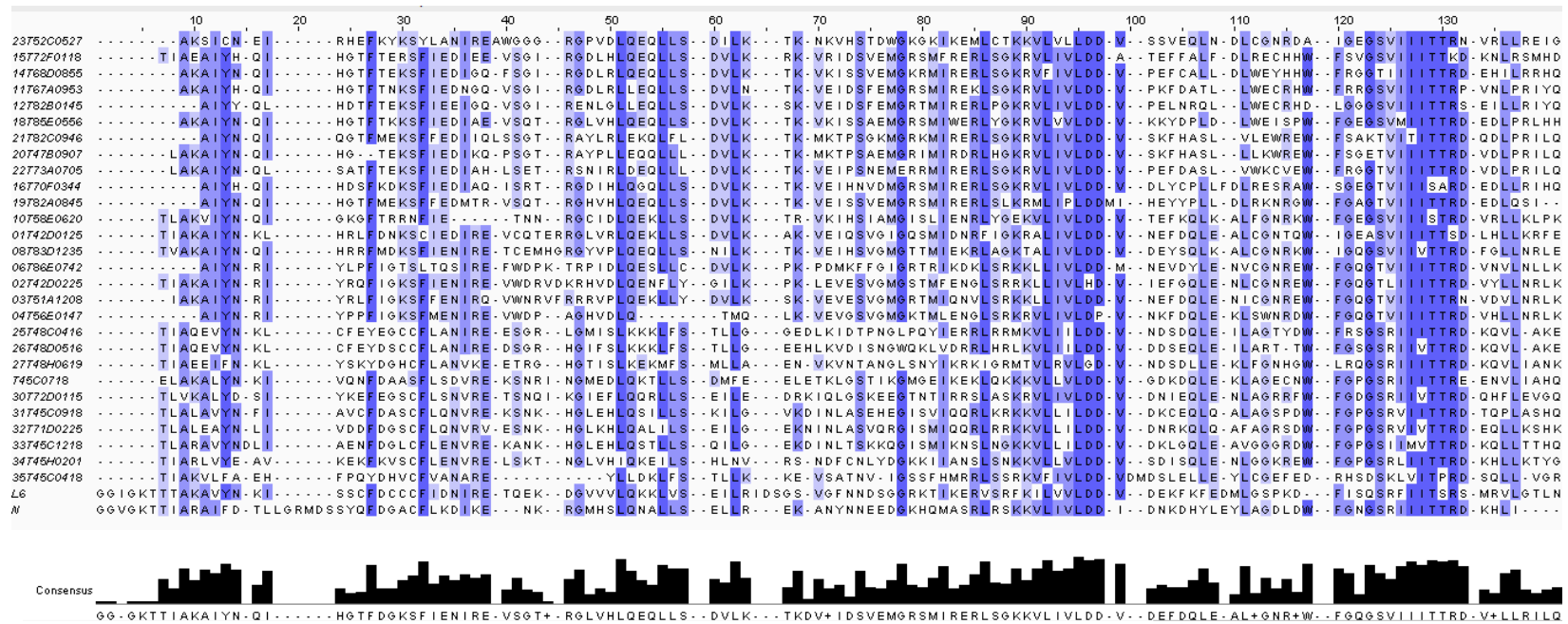
Annex 2- 1. Degenerate primers designed from NBS domain for TIR and non-TIR type genes from R-genes and RGs from *M. truncatula*.

TIR		non-TIR	
GLPL		P-loop	
101	AI CCN WSI TTR RAI AAR CC	301	GN TAD TTY CAI TAD CGN TG
107a	GAI CGI DAI CWN YRI TAD CC	302	TTY ACR CYI CCI RRI GGI DV
107b	AAI CGI DAI CWN YRI TAD CC	303 ^a	ACR TYI CCI CAI GGT DWI YR
108 ^a	ATR MSI HST CCI RAI GGI RA	303b	ACR CYI CCI CAI GGT DWI SR
108 ^a	ATR MSI HSC CCI RAI GGI RA	303c	ACR TYI CCI RAI GGC DWI SR
108 ^a	ATR MSI HSG CCI RAI GGI RA	303d	ACR CYI CCI RAI GGC DWI SR
108 ^a	ATR MSI HSA CCI RAI GGI RA	303e	ACR TYI CCI RAI GGG DWI SR
102	CTY CAI TAD CCI SWI GTR RA	303f	ACR CYI CCI RAI GGG DWI SR
103	TAD CCI WSI TTR RAI TTY CC	303g	ACR TYI CCI RAI GGA DWI SR
104	TY CAI DAI CCI WSI ATR RA	303h	ACR CYI CCI RAI GGA DWI SR
109 ^a	GGI RAN CGI RAT YTI CDI RA	304	GGI TAD CGI SGI TTY YGI DA
109b	GGI RAN CGI RAC YTI CDI RA	305	CCI YAN GGI RAI CGI TAD KC
109c	GGI RAN CGI RAG YTI CDI RA	306	TTY TTY ACR BMI CCI MAI GG
109d	GGI RAN CGI RAA YTI CDI RA	307	TTY CTY TAD CAN TTY TTY AC
105	AAC TTY WSI CGI RAI HSI KC	308	GGI RAI CGN CGI TTY CAN RA
106	ATR CGI TTY CCI TWD GGN RA	309	GGI RAN CGI TAD CAI CGN YA
P-loop		GLPL	
201	ATG GTN GGI HTI TWY GGN A	401	GGN ATI GGI AAN ACI RCI HT
202	GGN GGI ATN GGI AAR WSN AC	402	ATG GGN GGI BTI GGN AAR AC
203	CAY GTI GCN RAY TAY CCN GT	403	GTN TAY CCI ATH GTN GGI BT
204	ATN GTI GGI ATH TAY GGN A	404	AR GAY AAR GAR MAI RTN GT
205	ATG YTI GRI ATH TAY GGN G	405	CAR YTI GTN TAY AAY GAY G
206	GGN ATH TGG GGI ATG RSN GG	406	SN CAR YTI RTI TAY AAY GA
207	GAY GAY YTI ATH GGN ATH CA	407	GGN AAR ACI ACI YTN GCN AA
208	ATG GGN GGI RTN GGN AAR AC	408	GGI AAR ACI WSN YTI GCN MA
		409	GGI NKI GGI AAR ACI AYN YT

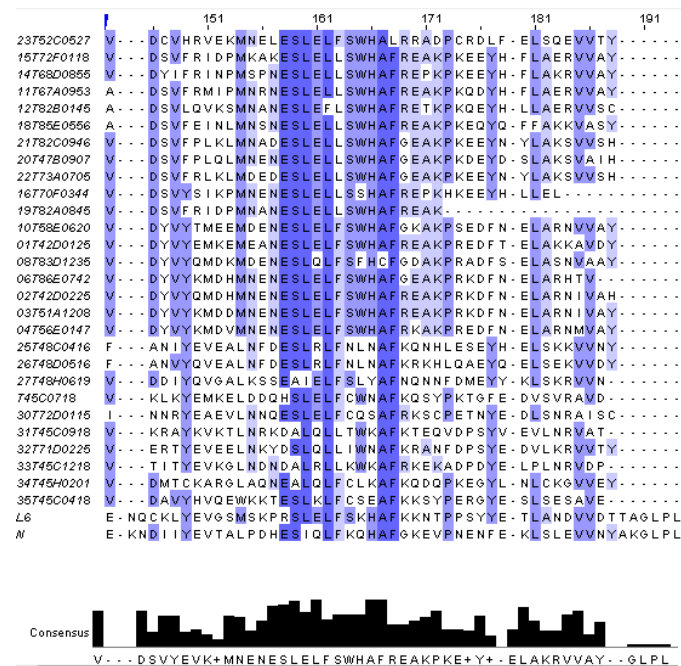
Annex 2- 2. Sequences from legumes downloaded at GenBank and used to construct the phylogenetic (grey highlights).

<i>Cicer arietinum</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Lens culinaris</i>	<i>Medicago truncatula</i>
CaDQ276909.1	VfDQ276888.1	VfDQ276940.1	LcAJ516060.1	MtAZ773476.1
CaDQ276915.1	VfDQ276900.1	VfDQ276941.1	LcAJ516063.1	MtAZ773477.1
CaDQ276928.1	VfDQ276935.1	VfDQ276942.1	LcAJ516066.1	MtAZ773478.1
CaDQ276929.1	VfDQ276944.1	VfDQ276943.1	LcAJ516069.1	MtAZ773479.1
CaDQ276931.1	VfDQ276949.1	VfDQ276945.1	LcAJ516070.1	MtAZ773480.1
CaDQ276933.1	VfDQ276889.1	VfDQ276946.1	LcAJ516072.1	MtAZ773481.1
CaDQ276896.1	VfDQ276890.1	VfDQ276947.1	LcAJ516073.1	MtAZ773482.1
CaDQ276897.1	VfDQ276891.1	VfDQ276948.1	LcAJ516075.1	MtAZ773483.1
CaDQ276898.1	VfDQ276892.1	VfDQ276950.1	LcAJ516076.1	MtAZ773501.1
CaDQ276899.1	VfDQ276893.1	VfDQ276951.1	LcAJ516079.1	MtAZ773502.1
CaDQ276910.1	VfDQ276894.1	VfDQ276952.1	LcAJ516080.1	MtAZ773504.1
CaDQ276911.1	VfDQ276895.1	VfDQ276953.1	LcAJ516091.1	MtAZ773508.1
CaDQ276912.1	VfDQ276901.1	VfDQ276887.1	LcAJ516061.1	MtAZ773509.1
CaDQ276913.1	VfDQ276902.1		LcAJ516062.1	MtAZ773511.1
CaDQ276914.1	VfDQ276903.1		LcAJ516064.1	MtAZ773514.1
CaDQ276916.1	VfDQ276904.1		LcAJ516065.1	MtAZ773515.1
CaDQ276917.1	VfDQ276905.1		LcAJ516067.1	MtAZ773516.1
CaDQ276924.1	VfDQ276906.1		LcAJ516068.1	MtAZ773517.1
CaDQ276925.1	VfDQ276907.1		LcAJ516071.1	MtAZ773518.1
CaDQ276926.1	VfDQ276908.1		LcAJ516074.1	MtAZ773519.1
CaDQ276927.1	VfDQ276918.1		LcAJ516077.1	MtAZ773496.1
CaDQ276930.1	VfDQ276919.1		LcAJ516078.1	MtAZ773497.1
CaDQ276932.1	VfDQ276920.1		LcAJ516081.1	MtAZ773498.1
CaDQ276954.1	VfDQ276921.1			MtAZ773499.1
CaDQ276955.1	VfDQ276922.1			MtAZ773500.1
	VfDQ276923.1			MtAZ773503.1
	VfDQ276934.1			MtAZ773505.1
	VfDQ276936.1			MtAZ773506.1
	VfDQ276937.1			MtAZ773507.1
	VfDQ276938.1			MtAZ773510.1
	VfDQ276939.1			MtAZ773512.1

Annex 2- 3. *. Aligment of deduced protein of 28 representative TIR sequences.

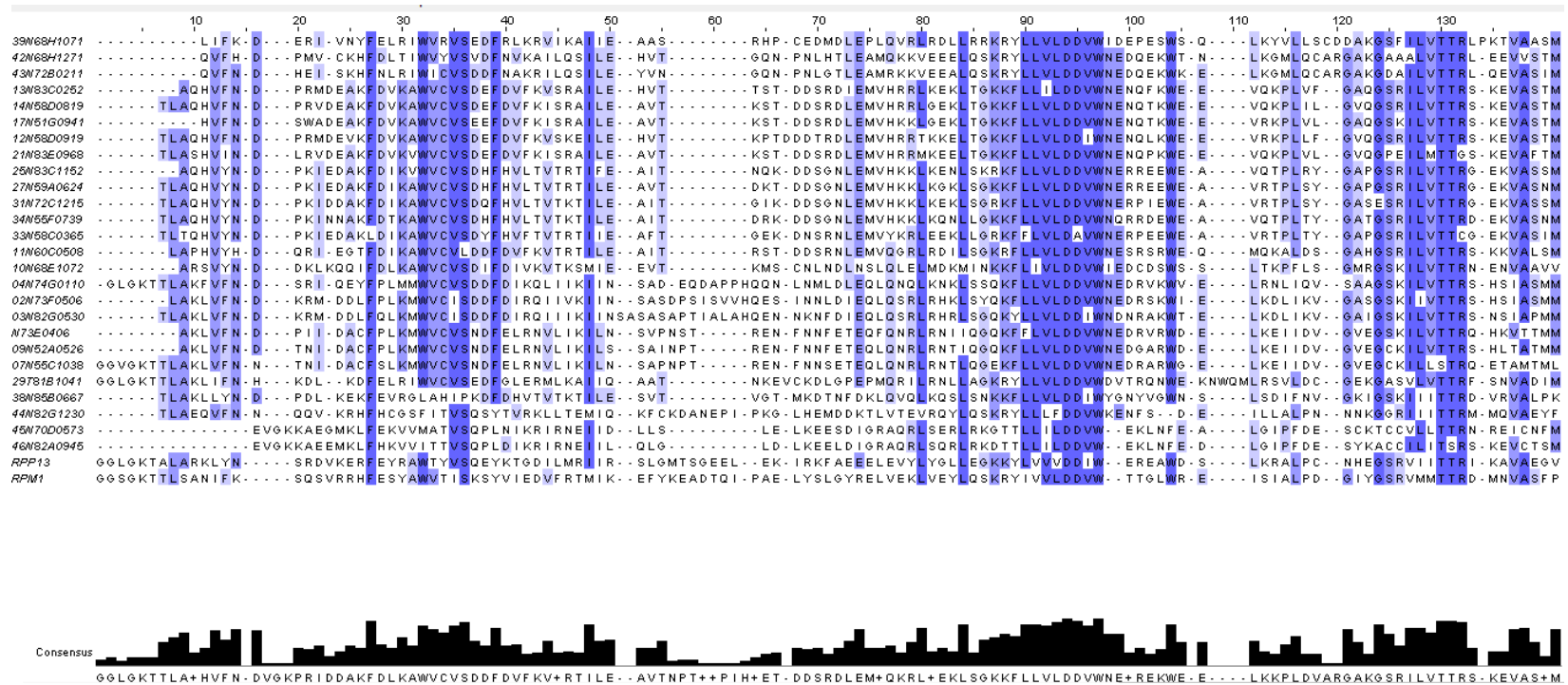


...continued

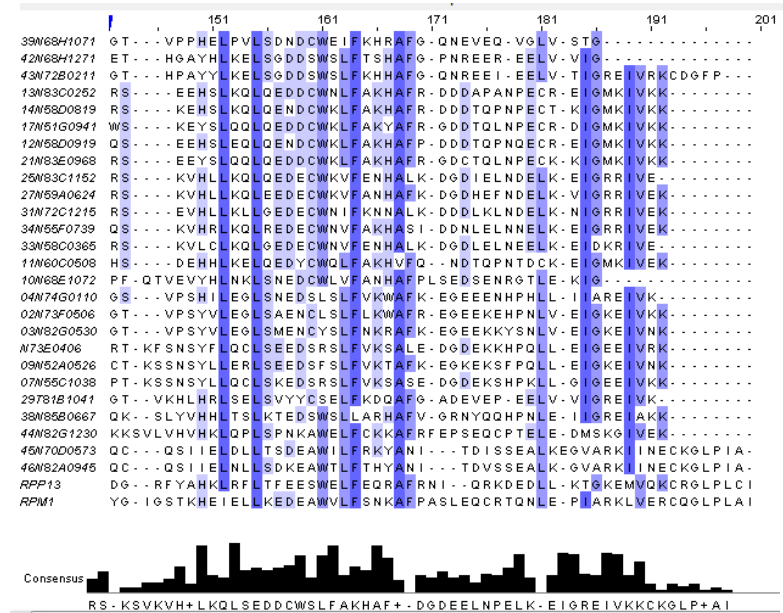


The residues are coloured according with the porcentaje identitiy taking consensus sequence as reference. Dark blue colour means residues with more than 80% of identitiy with the consensus sequences, light blue colors represent residues between 60 to 40% of identitiy. The residues without match to the consensus sequence are not coloured.

Annex 2- 4. Aligment of deduced protein of 26 non- TIR representative sequences.



.....Continued



Annex 2- 5. Sequence clusters according to phylogenetic tree and their Ka/Ks value.

Sequence 1	Sequence 2	Clade	Ka/Ks - PAML	Ka/Ks - DNAsp
JQ313628	JQ313634	Clade 1	0,34	0,33
JQ313629	JQ313630	Clade 2	0,39	0,38
JQ313629	JQ313631	Clade 2	0,47	0,45
JQ313631	JQ313630	Clade 2	0,55	0,53
JQ313625	JQ313626	Clade 6	0,18	0,18
JQ313621	JQ313622	Clade 10	1,15	1,13
JQ313621	JQ313623	Clade 10	0,95	0,93
JQ313623	JQ313622	Clade 10	0,74	0,73
JQ313615	JQ313614	Clade 11	1,34	1,33
JQ313616	JQ313614	Clade 11	0,83	0,83
JQ313617	JQ313614	Clade 11	1,68	1,68
JQ313615	JQ313616	Clade 11	1,05	1,04
JQ313615	JQ313617	Clade 11	1,55	1,53
JQ313616	JQ313617	Clade 11	1,07	1,07
JQ313612	JQ313607	Clade 12	0,44	0,44
JQ313613	JQ313607	Clade 12	0,53	0,53
JQ313612	JQ313613	Clade 12	0,37	0,38
JQ313609	JQ313608	Clade 13	0,56	0,56
JQ313610	JQ313608	Clade 13	1,06	1,07
JQ313611	JQ313608	Clade 13	1,25	1,26
JQ313609	JQ313610	Clade 13	0,81	0,81
JQ313609	JQ313611	Clade 13	1,06	1,07
JQ313610	JQ313611	Clade 13	1,56	1,57
JQ313595	JQ313594	Clade 15	0,42	0,41
JQ313596	JQ313594	Clade 15	0,39	0,38
JQ313598	JQ313594	Clade 15	0,31	0,30
JQ313597	JQ313594	Clade 15	0,44	0,43
JQ313595	JQ313596	Clade 15	0,43	0,41
JQ313595	JQ313598	Clade 15	0,36	0,35
JQ313595	JQ313597	Clade 15	0,54	0,53
JQ313596	JQ313598	Clade 15	0,27	0,26
JQ313596	JQ313597	Clade 15	0,45	0,44
JQ313598	JQ313597	Clade 15	0,43	0,42
JQ313590	JQ313589	Clade 16	0,26	0,24
JQ313591	JQ313589	Clade 16	0,32	0,30

Continued..

Sequence 1	Sequence 2	Clade	Ka/Ks - PAML	Ka/Ks - DNAsp
JQ313592	JQ313589	Clade 16	0,50	0,47
JQ313593	JQ313589	Clade 16	0,37	0,35
JQ313590	JQ313591	Clade 16	0,26	0,25
JQ313590	JQ313592	Clade 16	0,36	0,34
JQ313590	JQ313593	Clade 16	0,25	0,24
JQ313591	JQ313592	Clade 16	0,36	0,34
JQ313591	JQ313593	Clade 16	0,22	0,21
JQ313592	JQ313593	Clade 16	0,44	0,42
JQ313601	JQ313600	Clade 18	0,42	0,40
JQ313602	JQ313600	Clade 18	0,36	0,34
JQ313601	JQ313602	Clade 18	0,33	0,32
JQ313583	JQ313582	Clade 19	0,296	0,29
JQ313584	JQ313582	Clade 19	0,149	0,13
JQ313585	JQ313582	Clade 19	0,289	0,27
JQ313606	JQ313582	Clade 19	0,237	0,22
JQ313586	JQ313582	Clade 19	0,193	0,18
JQ313583	JQ313584	Clade 19	0,217	0,20
JQ313583	JQ313585	Clade 19	0,307	0,29
JQ313583	JQ313606	Clade 19	0,271	0,26
JQ313583	JQ313586	Clade 19	0,189	0,18
JQ313584	JQ313585	Clade 19	0,306	0,28
JQ313584	JQ313606	Clade 19	0,308	0,28
JQ313584	JQ313586	Clade 19	0,263	0,24
JQ313585	JQ313606	Clade 19	0,662	0,64
JQ313585	JQ313586	Clade 19	0,358	0,34
JQ313606	JQ313586	Clade 19	0,311	0,30

References

- Aarts, M.G.M., B. te Lintel Hekkert, E.B. Holub, J.L. Beynon, W.J. Stiekema, and A. Pereira. 1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(4): 251–258.
- Ameline-Torregrosa, C., B.B. Wang, M.S. O'Bleness, S. Deshpande, H. Zhu, B. Roe, N.D. Young, and S.B. Cannon. 2008. Identification and characterization of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 146(1): 5–21.
- Azhar, M., and J.S. Heslop-Harrison. 2008. Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. *Cytogenetic and Genome Research* 121(1): 59–66.
- Bailey, T.L., and M. Gribskov. 1998. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* 14(1): 48–54.
- Bassett, M.J. 2004. List of genes - *Phaseolus vulgaris*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative - BIC, 47: 1–5.
- Bertoli, D., S. Leal-Bertoli, M. Lion, V. Santos, G. Pappas, S. Cannon, and P. Guimarães. 2003. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 34–45.
- Blair, M., H. Buendía, M. Giraldo, I. Métais, and D. Peltier. 2008. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris*; L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 118: 91–103.
- Broughton, W.J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. 252(1): 55–128.
- Cannon, S.B., H. Zhu, A.M. Baumgarten, R. Spangler, G. May, D.R. Cook, and N.D. Young. 2002. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *Journal of Molecular Evolution* 54(4): 548–562.
- Choi, S.S., and B.T. Lahn. 2003. Adaptive evolution of MRG, a neuron-specific gene family implicated in nociception. *Genome Research* 13: 2252–2259.
- Creusot, F., C. Macadré, E.F. Cana, C. Riou, V. Geffroy, M. Sévignac, M. Dron, and T. Langin. 1999. Cloning and molecular characterization of three members of the NBS-LRR subfamily located in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris*. *Genome* 42(2): 254–264.
- Dangl, J.L., and J.D.G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature (London)* 411(6839): 826–833.

- Dellaporta, S., J. Wood, and J. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19–21.
- Ellis, J., and D. Jones. 1998. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1(4): 288–293.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. En: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Consulta: Noviembre, 2011.
- Ferrier-Cana, E., V. Geffroy, C. Macadré, F. Creusot, P. Imbert-Bolloré, M. Sévignac, and T. Langin. 2003. Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 106(2): 251–261.
- Ferrier-Cana, E., C. Macadré, M. Sévignac, P. David, T. Langin, and V. Geffroy. 2005. Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC-NBS-LRR gene JA1tr of *Phaseolus vulgaris*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 110(5): 895–905.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol* 9: 275–296.
- Galeano, C., A. Fernandez, N. Franco-Herrera, K. Cichy, McClean, Vanderleyden, and M. Blair. 2011. Saturation of an Intra-Gene Pool Linkage Map: Towards a Unified Consensus Linkage Map for Fine Mapping and Synteny Analysis in Common Bean. *PLoS ONE* 6(12): e28135.
- Galeano, C., A. Fernandez, M. Gomez, and M. Blair. 2009. Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 10(1): 629.
- Geffroy, V., F. Creusot, J. Falquet, M. Sévignac, A.F. Adam-Blondon, H. Bannerot, P. Gepts, and M. Dron. 1998. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* 96(3/4): 494–502.
- Geffroy, V., C. Macadré, P. David, A. Pedrosa-Harand, M. Sévignac, C. Duga, and T. Langin. 2009. Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181(2): 405–419.
- Geffroy, V., D. Sicard, J.C.F. de Oliveira, M. Sévignac, S. Cohen, P. Gepts, C. Neema, T. Langin, and M. Dron. 1999. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(9): 774–784.
- Gepts, P., F.J.L. Aragão, E. de Barros, M.W. Blair, R. Brondani, W. Broughton, I. Galasso, G. Hernández, J. Kami, P. Lariguet, P. McClean, M. Melotto, P. Miklas,

- P. Pauls, A. Pedrosa-Harand, T. Porch, F. Sánchez, F. Sparvoli, and Yu KangFu. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. p. 113–143. In *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, Volume 1. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.
- Guzman, O., R.L. Gilbertson, R. Nodari, W.C. Johnson, D. Temple, D. Mandala, A.B.C. Mkandawiew, and P. Gepts. 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology* 85: 600–607.
 - Hall, B. 2008. *Phylogenetic Trees Made Easy*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 233p.
 - Hammond-Kosack, K.E., and J.D.G. Jones. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48(1): 575–607.
 - Hanai, L.R., L. Santini, L.E.A. Camargo, M.H.P. Fungaro, P. Gepts, Tsai SiuMui, and M.L.C. Vieira. 2010. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. *Molecular Breeding* 25(1): 25–45.
 - Kanazin, V., L.F. Marek, and R.C. Shoemaker. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11746–11750.
 - Kohler, A., C. Rinaldi, S. Duplessis, M. Baucher, D. Geelen, F. Duchaussoy, B. Meyers, W. Boerjan, and F. Martin. 2008. Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology* 66: 619–636.
 - Kozjak, P., J. Jakše, and B. Javornik. 2009. Isolation and sequence analysis of NBS-LRR disease resistance gene analogs from hop *Humulus lupulus* L. *Plant Science* 176: 775–82.
 - Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini, and C. Gebhardt. 1996. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genet* 14: 421–429.
 - Leister, D., J. Kurth, D.A. Laurie, M. Yano, T. Sasaki, K. Devos, A. Graner, and P. Schulze-Lefert. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(1): 370–375.
 - Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
 - Liu, Z., M. Crampton, A. Todd, and V. Kalavacharla. 2012. Identification of expressed resistance gene-like sequences by data mining in 454-derived transcriptomic sequences of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology* 12(1): 42.

- Liu, J.J., and A.K.M. Ekramoddoullah. 2003. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics* 270(5): 432–441.
- Liu, J., X. Liu, L. Dai, and G. Wang. 2007. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *Journal of Genetics and Genomics* 34(9): 765–776.
- López, C.E., I.F. Acosta, C. Jara, F. Pedraza, E. Gaitán-Solís, G. Gallego, S. Beebe, and J. Tohme. 2003. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93(1): 88–95.
- McClean, P.E., M. Lavin, P. Gepts, and S.A. Jackson. 2008. *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. p. 55–76. In *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, Volume 2. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.
- McIntyre, C.L., R.E. Casu, J. Drenth, D. Knight, V.A. Whan, B.J. Croft, D.R. Jordan, and J.M. Manners. 2005. Resistance gene analogues in sugarcane and sorghum and their association with quantitative trait loci for rust resistance. *Genome* 48(3): 391–400.
- Melotto, M., and J.D. Kelly. 2001. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. *Theoretical and Applied Genetics* 103(4): 508–517.
- Meyers, B.C., A.W. Dickerman, R.W. Michelmore, S. Subramoniam, B.W. Sobral, and N.D. Young. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal* 20(3): 317–332.
- Meyers, B.C., A. Kozik, A. Griego, H.H. Kuang, and R.W. Michelmore. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(4): 809–834.
- Michelmore, R.W., and B.C. Meyers. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* 8(11): 1113–1130.
- Miklas, P.N., J.D. Kelly, S.D. Beebe, and M.W. Blair. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105–131.
- Miller, R.N.G., D.J. Bertioli, F.C. Baurens, C.M.R. Santos, P.C. Alves, N.F. Martins, R.C. Togawa, M.T. Souza Júnior, and G.J. Pappas Júnior. 2008. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biology* 8(15): (30 January 2008).

- Monosi, B., R.J. Wisser, L. Pennill, and S.H. Hulbert. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 109(7): 1434–1447.
- Nair, R.A., and G. Thomas. 2007. Isolation, characterization and expression studies of resistance gene candidates (RGCs) from *Zingiber* spp. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 116(1): 123–134.
- Palomino, C., Z. Satovic, J.I. Cubero, and A.M. Torres. 2006. Identification and characterization of NBS-LRR class resistance gene analogs in faba bean (*Vicia faba* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 49(10): 1227–1237.
- Pan, Q., Y.-S. Liu, O. Budai-Hadrian, M. Sela, L. Carmel-Goren, D. Zamir, and R. Fluhr. 2000a. Comparative Genetics of Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat Resistance Gene Homologues in the Genomes of Two Dicotyledons: Tomato and Arabidopsis. *Genetics* 155(1): 309–322.
- Pan, Q., J. Wendel, and R. Fluhr. 2000b. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *Journal of Molecular Evolution* 50(3): 203–213.
- Peñuela, S., D. Danesh, and N.D. Young. 2002. Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of nonTIR NBS-LRR genes in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 104(2/3): 261–272.
- Priya, R.S., and R.B. Subramanian. 2008. Isolation and molecular analysis of R-gene in resistant *Zingiber officinale* (ginger) varieties against *Fusarium oxysporum* f.sp. *zingiberi*. *Special Section: Exploring horizons in biotechnology: a global venture* 99(11): 4540–4543.
- Radwan, O., S. Gandhi, A. Heesacker, B. Whitaker, C. Taylor, A. Plocik, R. Kesseli, A. Kozik, R.W. Michelmore, and S.J. Knapp. 2008. Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Molecular Genetics and Genomics* 280(2): 111–125.
- Ramírez, M., M.A. Graham, L. Blanco-López, S. Silvente, A. Medrano-Soto, M.W. Blair, G. Hernández, C.P. Vance, and M. Lara. 2005. Sequencing and Analysis of Common Bean ESTs. *Building a Foundation for Functional Genomics. Plant Physiology* 137(4): 1211–1227.
- Reddy, I.N.B.L., D.S. Reddy, M.L. Narasu, and S. Sivaramakrishnan. 2011. Characterization of disease resistance gene homologues isolated from finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn). *Molecular Breeding* 27(3): 315–328.
- Rivkin, M.I., C.E. Vallejos, and P.E. McClean. 1999. Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome* 42(1): 41–47.
- Samuelian, S.K., A.M. Baldo, J.A. Pattison, and C.A. Weber. 2008. Isolation and linkage mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and classification among 270 Rosaceae NBS-LRR genes. *Tree Genetics and Genomes* 4(4): 881–896.

- Sandlin, C.M., J.R. Steadman, C.M. Araya, and D.P. Coyne. 1999. Isolates of *Uromyces appendiculatus* with specific virulence to landraces of *Phaseolus vulgaris* of Andean origin. *Plant Disease* 83: 108–113.
- Schlueter, J.A., J.L. Goicoechea, K. Collura, N. Gill, J.Y. Lin, Y.S. Yu, D. Kudrna, A. Zuccolo, C.E. Vallejos, M. Muñoz-Torres, M.W. Blair, J. Tohme, J. Tomkins, P. McClean, R.A. Wing, and S.A. Jackson. 2008. BAC-end sequence analysis and a draft physical map of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genome. *Tropical Plant Biology* 1(1): 40–48.
- Schwartz, H.F., J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster. 2005. Compendium of bean diseases. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul.
- Shen, K.A., B.C. Meyers, M.N. Islam-Faridi, D.B. Chin, D.M. Stelly, and R.W. Michelmore. 1998. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(8): 815–823.
- Vallejos, C.E., G. Astua-Monge, V. Jones, T.R. Plyler, N.S. Sakiyama, and S.A. Mackenzie. 2006. Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 172(2): 1229–1242.
- Vallejos, C.E., N.S. Sakiyama, and C.D. Chase. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131(3): 733–740.
- Xu, X., S. Kawasaki, T. Fujimura, and Wang, C.T. 2005. A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves. *Plant Molecular Biology Reporter* 23(3): 291–295.
- Yaish, M.W.F., L.E. Sáenz de Miera, and M. Pérez de la Vega. 2004. Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from *Lens* species. *Genome* 47(4): 650–659.
- Yang, Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1586–1591.
- Young, N.D. 2000. The genetic architecture of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3(4): 285–290.
- Yu, Y.G., G.R. Buss, and M.A. Saghai Maroof. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11751–11756.
- Zhang, H., Wang YueJin, Zhang ChaoHong, Wang XiPing, Li Huie, and Xu WeiRong. 2011. Isolation, characterization and expression analysis of resistance gene candidates in pear (*Pyrus* spp.). *Scientia Horticulturae* 127(3): 282–289.
- Zhu, H.Y., S.B. Cannon, N.D. Young, and D.R. Cook. 2002. Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(6): 529–539.

3. Identification of resistance genes homologues in the G19839 BAC library and mapping of BES-derived microsatellite markers associated with these resistance genes



Abstract

The strategy of resistance gene homologues (RGH) cloning has proven to be an efficient tool for identifying markers and genes associated with diseases resistance. In common bean (*Phaseolus vulgaris*), the identification of markers linked to disease resistance has been a goal of many researchers, since its crop is severely constrained by many different pathogens. Microsatellite (Simple Sequence Repeat or SSR) are among the most informative molecular markers developed to date. In this context, the main goal of this study was the identification and evaluation of SSR markers associated with RGH genes (named RGH-SSRs or BMr markers). This required 1) hybridizing a BAC library made from the Andean genotype G19833, 2) evaluating probes designed from specific common bean RGHs and 3) developing of microsatellites found in the end sequences of positive BACs.

The new RGH-SSRS were named as BMr (Bean Microsatellite RGA-associated markers) with a total of 629 BMr identified and which were initially evaluated in the parental genotypes G2333 (resistant to *C. lindemuthianum*) and G19839 (susceptible to *C. lindemuthianum*). Genetic mapping was then performed with 205 polymorphic BMr markers in the RIL population from these two parents G2333 x G19839. One hundred and fifty five BMr markers were mapped and distributed along the eleven common bean linkage groups, where marker clustering was evident. The saturation of the G2333 x G19839 map with RGH-SSRs markers is valuable for identification of genes and/or QTL associated with resistance to different diseases that currently reduce common bean production.

Key words: BAC library, BES, common bean, G19833, G2333, G19839, SSR, RGH.

Introduction

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is regarded as one of the most important legumes around the world. More than 20 millions tons of seed were produced in 2009, involving production in 121 countries. More than fifty percent of common bean is harvested in Brazil, India, China, the United States of America and Mexico (FAO, 2011). Two major gene pools have been established, namely the Andean and Mesoamerican gene pools (Singh et al., 1991; Debouck et al., 1993). This differentiation has been confirmed by morphological, agronomical and biochemical traits including phaseolin, isozymes as well as molecular markers (Singh et al., 1991; Gepts, 1998).

Production of common beans is constrained by different pathogens including, bacteria, fungi, phytoplasmas and viruses. Anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*), rust (*Uromyces appendiculatus*) and ascochyta (*Phoma exigua*) are considered the most important fungal diseases of this crop (Schwartz and Pastor-Corrales, 1989; Schwartz et al., 2005). Genetic of resistance is the most widely-used management strategy for these pathogens (Kelly and Vallejo, 2004). Thus, many major resistance (R) genes have been classically evaluated and molecularly tagged over 80 years of bean research.

Currently there is a wide interest in the use of resistance gene homologues (RGHs) for the identification of R-genes. This strategy is based on the design of degenerate primers from highly conserved sequence motifs characteristic of the nucleotide binding site (NBS) domain, such as Kin-2, Kin-3, P-loop and GLPL (Leister et al., 1996; Gebhardt and Valkonen, 2001; McIntyre et al., 2005; Totad et al., 2005; Mutlu et al., 2006). If there is a PCR amplicon from these degenerate primers with the desired size, it could be a resistance gene homologue. RGH genes are also known as resistance gene analogues (RGAs) (Leister et al., 1996), or resistance gene candidates (RGCs) (Zhang et al., 2011). Compared to the other domains common to R-genes such as LRR repeats or Toll-Interleukin receptor domains, the NBS domain has been associated almost exclusively with disease resistance (Leal-Bertioli et al., 2009). Thus, the use of RGHs is an informative strategy for identification of resistance genes and the probability of finding resistance genes through RGH cloning is higher than with other methodologies.

After the RGHs have been identified, a subsequent step consists on their validation within a population of interest. Because there are many traits of interest in common bean, additionally resistance to pathogens, a high number of mapping populations have been developed (Hall, 2003). Thus, genes associated with responses to biotic and abiotic stresses have been mapped in different segregating populations (Miklas et al., 2006). They usually have been evaluated with different markers, hence the comparisons among them and the linkage relation for the different genes are difficult (Hall, 2003). A common bean consensus map was constructed using the endogamic population from a cross between the Mesoamerican cultivar BAT93 and the Andean cultivar JaloEEP558 (abbreviation BJ), (Freyre et al., 1998). Likewise, Blair et al. (2003), used microsatellite markers to integrate DOR364 x G19833 with this previous populations. The advantages of these crosses is the high level of polymorphism, because the parents belong to mesoamerican and andean gene pools (Miklas et al., 2006). Currently, there are a high number of mapping populations with new consensus maps under development (Galeano et al., 2011). The genotypes used in these crosses are characterized to have indeterminate growth habit. However, there is one population from parental with determinate growth habit; from the cross between G2333 with G19839. G2333 is an Andean genotype which is recognized around the world because its high level of resistance to *C. lindemuthianum* and G19839 comes from a Mesoamerican region. A more saturated genetic map of RIL (Recombinant Inbreeding Lines) population G2333 x G19839 (GxG) would allow identifying associated regions to resistance, specially anthracnose and ascochyta which are diseases limiting to Andean countries.

Crosses between genotypes from Andean and Mesoamerican gene pool are preferred in order to increase the polymorphism in the progeny (Gepts et al., 2008). In the case of disease resistance mapping, over twenty populations have been developed (Kelly et al., 2003; Miklas et al., 2006; Miklas and Singh, 2007) for mapping genes to disease resistance to common bacterial blight (CBB), Bean common mosaic virus (BCMV), Bean golden mosaic virus (BGMV), Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV), *C. lindemuthianum*, *Phaseoisariosis griseola*, *Uromyces appendiculatus*, *Rhizobium* spp. web blight, rust, Ashy stem blight, bacterial brown spot (BBS), and *Fusarium* root rot, white mold). Eleven of these populations are RILs, three were constructed from backcrossing method and two populations were used in the F2 generation (Kelly et al. 2003).

Additionally to mapping populations, the construction of BAC libraries is another tool to study and assemble the structure of a specific genome. Ten BAC libraries have been developed in *Phaseolus vulgaris* and additionally there is one for *Phaseolus lunatus* (Gepts et al., 2008). The BAC libraries have represented wild beans landraces, breeding lines, cultivars and bred varieties. The libraries from the *P. vulgaris* genotypes BAT93, DGD1962, G2771, G19833, G12949, OAC H45, G2333 and *P. lunatus* were digested with *HindIII*; HR67 and OAC Rex with *BamHI* and the genotype Sprite with *EcoRI*. Based on their average insert size most libraries have genome coverage of 5–12x. (Gepts et al., 2008).

Molecular markers also have been a key point in common bean study. A molecular marker is defined as an identifiable DNA region whose inheritance can be followed along generations, and they have become a powerful tool in many areas of biology, plant breeding and genetics (Maia et al., 2008). In the last two decades, a large number of PCR based markers have been developed for multiple maps. Principal amount these are microsatellites, which are also known as simple sequence repeat (SSRs), short tandem repeat (STR) and simple repetitive sequence (SRS). SSRs markers consist of sequences with a repeated motif of one or few bases (from 1 to 6 bp) tandemly repeated for variable numbers of times (Morgante et al., 2002). They are classified as perfect if there is a uninterrupted repeat unit, imperfect when the repeat unit is interrupted by base substitutions and compound if there are two or more repeat units (Sharma et al., 2007). They are abundant in eukaryotic genomes, highly polymorphic, reproducible, multi-allelic, usually co-dominant and transferable between mapping populations (Martins et al., 2005)

Microsatellites can be identified by different strategies including searches in genomic libraries, enriched libraries, BAC or YAC libraries and cDNA libraries; or can be sourced from public databases such as GenBank, especially in EST collections or BAC-end sequences (Varshney et al., 2005; Varshney, 2009). The use of a specific source of microsatellites depends of the time/labor cost for development, polymorphism, transferability, ability to derive large numbers of SSR, bias in repeat types and reliance on prior research (Scott, 2001).

A number of programs for SSR identification have been developed based on detailed algorithms, increasing the number and quality of the SSR identified *in silico* and allowing high-throughput detection (Cordoba et al., 2010). Some of these programs are: an automated microsatellite marker development-AMMD (Martins et al., 2005), BatchPrimer3 (You et al., 2008), MISA (Thiel et al., 2003), REPEATMASKER (Smit et al., 1996), SPUTINICK (Abajian, 1994), SSRIT -Simple Sequence Repeat Tool- (Temnykh et al., 2001), SSR-locator-SSRL (Maia et al., 2008), Tandem Repeat Find-TRF (Benson, 1999) and TROLL (Castelo et al., 2002). The search criteria and stringency conditions used in each program could be different, resulting in the identification of different SSR. In these programs for identifying SSR, some of the main parameters are: Motif length (used to set the motif lengths as mono, di, tri, tetra, penta and/or hexa), and repeat minimum (used to set the minimum number of motif repetitions for SSRs of each motif length) (Martins et al., 2005).

Once developed, SSR markers have broad applications in genetics such as construction of high-resolution genetic maps to identify loci involved in disease resistance (Koreth et al., 1996; Varshney et al., 2005). Integration of SSR markers into the common bean genetic map was first carried out mapping 15 SSRs onto the BAT93 x JaloEEP558 map (Yu et al., 1996). Second by Blair et al. (2003) with 100 SSRs integrated into the DOR364 X G19833 map. Since then, additional SSR markers have been mapped in the DOR364 X G19833 population (Blair et al., 2008; Cordoba et al., 2010). An integrated genetic/physical map was developed for common bean using microsatellites identified in BAC-end sequences (BES) and genetically mapped in the DOR364 x G19833 population (Cordoba et al., 2010).

In peanut (*Arachis hypogaea* L.) a genetic map with a high density was established with SSR mined from BAC clones (BAC-derived SSR markers), taking advantage of this kind of markers have in the integration of genetic and physical maps. Some of these SSR were related to RGH sequences belonging a valuable information to study the distribution and organization of disease resistance genes in the peanut genome. Such information will facilitate marker assisted selection for disease resistance breeding and map-based cloning of resistance genes (Wang et al., 2012)..

All of these studies show the utility of SSR markers to construct and saturate common bean genetic linkage maps and linking it to physical maps.

Thus, the goals of the present study were to evaluate probes designed from RGHS of common bean in the G19833 BAC library, in order to identify positive clones with SSR markers localized in BAC-end Sequences (named BMR- Bean Microsatellite RGA-associated markers or RGH-SSR). Once the RGH-SSR were identified its polymorphism was evaluated in G2333 and G19839 parentals and the polymorphic markers were used to saturate the RIL population G2333 x G19839 as a tool to further identify region of interest through linkage studies. Although this population has been used to map regions associated to yield, climbing ability (Checa and Blair, 2008, 2012), adventitious root formation (Ochoa et al., 2006), phytate and phosphorus contents in seed (Blair et al., 2009) and stem maggot resistance (Fitstun, A. Unpublished), this is the first time that it is used to map resistance to anthracnose. This is important because G2333 is recognized as the most valuable source of resistance and this population was developed from common bean genotypes with indeterminate growth habit.

3.1 Materials and Methods

3.1.1 G19833 BAC library evaluation

The evaluation was done using the G19833 BAC library provided by Clemson University Genome Center, which contains 55,296 clones with an average insert size of 145 kb, distributed in 144 plates (348 wells). The library is screened by filter hybridization and is blotted on three nylon filters. Because of the estimated genome size of *P. vulgaris* (656 Mb) this BAC library has a coverage of 12.2 haploid genome equivalents (Schlueter et al., 2008).

3.1.2 Probe design

RGHs sequences specific to common bean were identified as described in Chapter 1. Briefly, 544 degenerate primers were designed based on R genes and RGHs from *Medicago truncatula* with similarity to RGHs were identified.

All of different combinations of TIR and non-TIR based primers were used to amplify PCR products from G19833 and these were cloned and sequenced. A total of 403 sequences with similarity to RGH were identified of which 193 sequences showed similarity to TIR genes and 210 with non-TIR genes. Multiple alignment of the RGH bean nucleotide sequences, were performed using MAFFT software (FFT-NS-i, slow iterative refinement method) (Kato et al., 2005). TIR and non-TIR sequences were aligned independently in order to identify closely related sequences and to select a subset of unique sequences for the design of hybridization probes. Clustering in clades of highly similar sequences (>90% nucleotide identity) was carried out with the program JALVIEW (Clamp et al., 2004), <http://www.jalview.org/>). One representative sequence of each clade was selected using CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) and these conservative sequences were used for probe design. Each probe was evaluated using Primer3 software (You et al., 2008) and excluding the first and last 30 pb of each sequence. The probes were amplified using G19833 DNA as a template. Subsequently, the PCR products were sequenced with an ABI 3730 XL capillary sequencer, to validate the presence of respective TIR or non-TIR sequences.

3.1.3 Filter hybridization

An aliquot of 60ng of the purified PCR product was labeled with radioactive ^{32}P using the Ready-to-Go labeling protocol (Amersham, Biosciences Corp.) Prehybridization was performed by 12 hours at 65°C in a solution containing 0.25M sodium phosphate buffer pH 7.2 buffer; 7% SDS, and 1mM NaEDTA in a hybridization oven at rotation speed of 4 rpm. The solution was replaced twice. Once the filters were rinsed thoroughly with prehybridization buffer, 20-30 ml of fresh pre-heated hybridization buffer were added into the bottles followed by the denatured probes under denaturing conditions. Eight probes were hybridized together per bottle, for a total of ten hybridization assays; in the first four assays only were hybridized probes designed from TIR sequences, in the last five assays

were evaluated probes designed only from non-TIR sequences, but the assay number five was a mix of five probes derived from TIR sequences and three from non-TIR sequences. The hybridization process was done at 60°C overnight at 3-4 rpm. Following the hybridization, the filters were rinsed with 40-50 ml of a solution contained 2X SSC - 0.1%SDS previously preheated to 60°C. Two washes were performed for 30 min at 65°C with rotation in large containers having 1 liter each of 1X SSC - 0.1% SDS and 0.5X SSC - 0.1% SDS, respectively. After washing, the filters were dried briefly on filter paper and were covered with clingwrap on both sides. Prehybridization, hybridization and washing of filters were done under high stringency conditions. After pre- hybridization, hybridization and washing, with these stringency conditions the filters were transfer to phosphor image plates (FUJIFILM, Company) overnight and the films were scanned with a phosphor imager (Storm 820, Molecular Dynamics). The positive clones were scored with the program ComboScreen (Jamison et al., 2000), with confirmation through the Purdue University collaboration (Scott Jackson personal communication).

The ID number of each positive clone was looked for on the web WebFPC of common bean (at <http://Phaseolus.genomics.purdue.edu/WebAGCoL/Phaseolus/WebFPC>), in order to establish if the clone was part of a contigs or was classified as a singleton.

3.1.4 Identification and evaluation of SSR markers

Three strategies were used to identify SSR markers. In the first one, the positive clone sequences were found in the G19833 BAC End Sequences (BES) database (http://Phaseolus.genomics.purdue.edu/data/pv_gba_bes.fasta). Clones associated with a BES (RGH-BES) were evaluated for the presence of one or more previously reported SSR loci (http://Phaseolus.genomics.purdue.edu/data/pv_gba_ssr_primers.txt) from (Schlueter et al., 2008). These SSR had been identified by Batchprimer3 (You et al., 2008) and most of them were previously mapped as described in (Cordoba et al., 2010). Other SSR markers were included from a BES-SSR study using SSR Locator (SSRL) (Maia et al., 2008) and the Automated Microsatellite Marker Development (AMMD) (Martins et al., 2005) computer programs and also mapped by Cordoba et al. (2010). The SSR markers associated directly with a RGH-BES marker were called primary hits. If the positive BAC

clone did not include a SSR marker, then the respective BAC contig was evaluated for SSRs which were referred to as secondary hits.

The new SSR markers were denominated BMr markers (bean microsatellite RGH-associated) microsatellites and were evaluated for parental polymorphisms. This was done with two mapping population parents: G2333 from the Mesoamerican gene pool which is a climbing bean (type IV) and G19839 belongs to the Andean gene pool with indeterminate growth habit (Type III) (Ochoa et al., 2006; Checa and Blair, 2008)

3.1.5 SSR amplification

PCR reactions for SSR amplification contained 25 ng of total DNA template, 1X buffer (500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% Triton X-100, 1mg mL⁻¹ bovine serum albumin), 0.10 µM of each primer (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), 0.20 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1 unit of *Taq* DNA polymerase, and HPLC grade H₂O. Each PCR reaction was carried out in a final volume of 15 µL. Amplification was carried out on PTC-200 thermocyclers (MJ Research Inc, Watertown, MA), programmed for an initial denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by a touchdown program (55°C-45°C) of 10 cycles at 94°C 30 seconds, 55°C (with -1°C decrease per cycle) 30 seconds, 72°C 45 seconds. Then 25 cycles at 94°C 30 seconds, 45°C 30 seconds and 72°C for 45 seconds, and a final extension at 72°C for 5 minutes. After SSR amplification, 5 µL of formamide containing 0.4% w/v bromophenol blue and 0.25% w/v xylene cyanol were added to each PCR sample. This mixture was denatured at 96°C for 5 min and then maintained on ice. The samples were loaded onto 4% polyacrilamide gels (29:1 acrylamide:bis-acrylamide) mounted on Owl Sequencing Chambers (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham MA), using a 8 channel multipipetter and run at 100 W, 50°C for 1 hour, in 0.5X TBE buffer (44.57 mM trizma base, 44.46 mM boric acid, 1mM EDTA, and pH 8.0). Silver staining according to the protocol of Blair et al. (2003) was used to visualize the PCR products. Molecular weight (MW) ladders of 10 and 25 pb were used to determine the size of the bands.

3.1.6 Genetic mapping

The polymorphic BMr markers were evaluated in the entire population of $F_{7:9}$ recombinant inbred lines (RIL), which were generated from the cross between G2333 and G19839. A preliminary genetic map for this population was built with the software Mapmaker 3.0 for Windows (Lander et al., 1987), using the matrix developed by Ochoa et al. (2006), which consisted of 167 markers. Genotyping results of the present work were registered in a matrix using an excel file. Alleles from the female parent were classified as “A” and from the male parent as “B”. Heterozygotes or missing data were defined as “-”. These markers were added to the matrix developed by Ochoa et al. (2006), using the program MapDisto v. 1.7 beta (<http://mapdisto.free.fr/>) with a LOD > 3.0. The “order” command was used to identify the bestmarker order for each linkage group and the “Ripple” command was used to validate the correct order. Genetic distances between markers in centimorgans (cM) were obtained using the Kosambi function, which assumes the interference in the recombination events. Mendelian segregation ratios and distortion from the expected 1:1 ratio in the RIL population G2333 x G19839, were calculated using chi-square tests. Map chart (Voorrips, 2002) was used to visualize and edit the genetic map with its linkage groups.

3.2 Results

3.2.1 Detection of RGH-SSR markers in G19833

A total of 403 different RGH sequences were found (Garzón et al., 2012) of which 158 were similar to ORF of TIR genes, 35 were TIR pseudogenes, 153 were similar to ORFs of non-TIR genes and 57 were non-TIR pseudogenes. From these 86 probes were designed for screening of the G19833 BAC library: 38 of these corresponding to TIR clades and 48 to non-TIR clades. Probes design was based both on singleton and clustered sequences as well as genes and pseudogenes (Table 3-1).

Sequences with a premature STOP codon or, without an ORF, which are considered as pseudogenes were also used for probes design. Table 3-1 shows the number of probes designed from 193 TIR sequences and 210 from non-TIR sequences. If the probe was designed from two or more sequences, it was classified as grouped. Singleton probes were ones designed from only one sequence, which did not share more than 90% identity

with any other sequence. Almost TIR probes were designed from grouped RGH sequences or grouped RGH sequences and pseudogenes. Meanwhile the most non-TIR probes were designed from singleton RGH sequences and grouped RGH sequences plus pseudogenes. For TIR and non-TIR type sequences, pseudogenes with a low identity value with other sequences were used for probe design because the interest in considering the maximal number of putative common bean RGHs.

Table 3- 1. Number of probes designed for TIR and non-TIR sequences

Probe class	TIR		non-TIR		General total
	No.	%	No.	%	
Grouped RGH sequences	11	29	8	17	19
Singleton RGH sequence	7	18	16	33	23
Grouped RGH sequences and pseudogenes	11	29	11	23	22
Grouped pseudogenes*	5	13	5	10	10
Singleton pseudogenes*	4	11	8	17	12
Total general	38		48		86
Total validated probes	37		43		80

* Probes designed exclusively for pseudogenes sequences.

After sequencing of PCR products a total of 37 TIR and 43 non-TIR probes were validated for filter hybridization. The evaluation of these probes was made using the G19833 BAC library filters, found in sets of three membranes per library. Eight probes were evaluated simultaneously. Hence, hybridization assays were done 10 times, in order to evaluate a total of 80 probes. Proper probe design was an important factor for successful hybridization. In this study the primer pairs designed for probe hybridization of the bean BAC library, had GC content of around 43% and 22 bp average length. Melting temperature T_m of forward and reversed primers ranges from 59 to 61 °C, with an average difference of T_m values in a primer pair of 0.4 °C. The expected product size according with the position of reverse and forward primers in the sequences ranged between 240 to 666 pb, with an average size of 408 pb.

Hybridization of the G19833 BAC library with the 80 PCR-based probes identified 3.202 positive BAC clones (Table 3-2, Figure 3-1). Table 3-2 shows the number of positive clones for each hybridization assay and the number of unique positive clones after

eliminating for redundancy. The table also breaks down whether the probes analyzed were designed from TIR or non-TIR sequences and the type probe class namely if belonging to a clustered RGH or singleton RGH.

Some clones hybridized with more than one probe, thus the positive clones were represented from one to five times (Table 3-3). For example, the BAC clone PV_GBa001L08 hybridized with probes in five out of ten assays, thus this clone was BAC clone had at least five different RGH sequences.

Out of the 3.202 positive BAC clones 1.451 were unique clones, which represented 2.902 clones from forward and reverse BACend sequences. Analysis done in the BAC-end bean database allowed to identify BES information for 2.319 of these BAC clones. A total of 1.766 BAC clones were distributed in 164 BAC contig and 553 BAC singletons.

Figure 3- 1.Positive clones in G19833 BAC library. The names Pv 1-48, 49-96, 97-144 indicate different filters, in which there are the 48 plates of BAC clones that are spotted in a double replicate pattern.

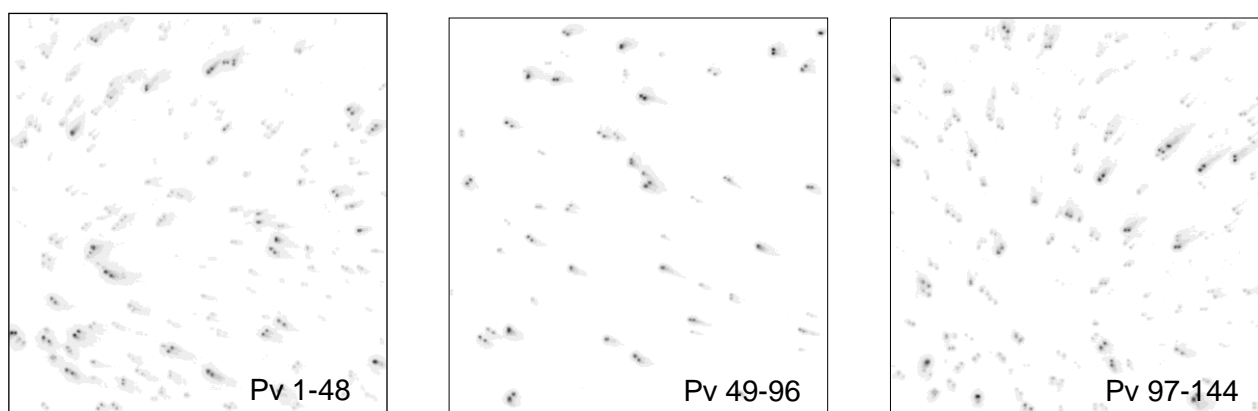


Table 3- 2. Positive bacterial artificial chromosome (BAC) clones and unique positive clones identified by 80 RGH probes in the G19833 library.

Assay number	Positives clones	Unique positive clones	% of unique positive clones	Origen probe
1	192	192	100.0	TIR
2	168	30	17.9	TIR
3	164	123	75.0	TIR
4	65	65	100.0	TIR
5	601	599	99.7	TIR - non TIR
6	573	195	34.0	non TIR
7	362	17	4.7	non TIR
8	406	99	24.4	non TIR
9	423	45	10.6	non TIR
10	248	86	34.7	non TIR
Total	3202	1451		

Table 3- 3. Number of bacterial artificial chromosoma (BAC) clones from the G19833 library hybridizing with different numbers of probes.

Number of probes	Number of positive BAC clones	%
1	657	21
2	548	17
3	732	23
4	460	14
5	805	25
Total	3202	100

3.2.2 Presence of SSRs within BAC clones containing RGA

More than 600 SSRs were identified in 2.319 BAC-end sequences from the 3.202 positive BAC clones (primary hits) or adjacent contigged BACs (secondary hits), using Batchprimer3, SSRLocator and AMMD bioinformatic tools. A total of 629 BMr (RGH-SSR) markers were named (Annex 3-1). The results are show in the Table 3-4 and were as follows: AMMD (319) detected more total SSR loci than Batchprimer3 (257) and SSRLocator the fewest (53). Batchprimer3 identified 55 primary hits (SSR identified

directly in a BES of a positive clone), which were distributed among 19 BAC contigs and 15 BAC singletons. The secondary hits were 202 SSRs distributed in 101 contigs. SSRLocator identified 20 primary hits, and almost half were in BAC singletons, in the case of secondary hits 33 SSR were identified and grouped in 24 contigs. AMMD identified the highest number of primary hits with 103 SSR distributed in 46 BAC contigs and 35 BAC singletons, and 181 secondary hits distributed in 70 BAC contigs.

Table 3- 4. Comparison of primary and secondary hits identified by Batchprimer3, SSRLocator and AMMD programs.

BMr Origen	Primary hits				Secondary hits		Total SSR
	Contig		Singleton	Subtotal	Contig		
	Contigs number	SSR number			Contigs number	SSR number	
Batchprimer3	19	40	15	55	101	202	257
SSRLocator	9	11	9	20	24	33	53
AMMD	46	103	35	138	70	181	319
Total SSR	74	154	59	213	195	416	629

The breakdown of SSR motifs found for the 629 BMr loci using the the bioinformatics software is summarized in Table 3.5. Out of the total, 277 loci were for di-nucleotide based SSR, 199 for tri-nucleotide and 139 for tetra, penta and hexa-nucleotides repeats. Therefore, since di or tri-nucleotide repeats were target for marker developed only 476 BAC-end sequences had this type of sequence.

In summary, the majority of BMr loci (277, 44%) contained dinucleotide SSR motif followed by trinucleotide repeats (199, 32%) (Table 3-5). Primary and secondary hits were similar in percentage of di or trinucleotide motifs except that SSRLocator had mostly dinucleotide type motifs (35%) and all secondary hits had this repeat type. Furthermore primary hits identified with AMMD were SSR with dinucleotide (32 %), trinucleotide (21 %) or tetranucleotide (29 %) repeat type with some being hexanucleotide or compound for AMMD and SSRLocator. The majority of secondary hits were trinucleotide (54 %) followed by dinucleotide (44%).

Batchprimer3, SSRL and AMMD identified primary and secondary hits (SSR in the same contigs as the positive BAC clones). In primary hits Batchprimer3 detected no hexanucleotide repeats while SSRLocator no pentanucleotide repeats and nothing but dinucleotide in secondary repeats. The utilization of three software programs to identify SSR loci was useful as each program detected some new loci compared to the other programs. Compound repeats were infrequent in all evaluations, especially Batchprimer3 which did not find this repeat type.

3.2.3 Evaluation of BMr markers

A selection of BMr markers were evaluated for polymorphism in G2333 and G19839 genotypes. Polymorphism level between these two genotypes was discriminated for primary/secondary hits and for each program Batchprimer3, SSRL and AMMD, and is shown in Table 3-6. Out of 213 primary hits, 95 were polymorphic representing 48% polymorphism on average for this type of BES-derived markers. The primary hits identified by Batchprimer3 and SSRLocator had polymorphism levels of 65%, which was higher than the BMr identified by AMMD with polymorphism value of 40%.

Table 3- 5. Motif types found at BMr loci identified as primary and secondary hits, using Batchprimer3, SSRL and AMMD

Repeat Type	Batchprimer3		SSRL		AMMD		Total
	Primary hit	Secondary hit	Primary hit	Secondary hit	Primary hit	Secondary hit	
Dinucleotide	24	89	7	33	44	80	277
Trinucleotide	13	57	3		29	97	199
Tetranucleotide	9	24	2		40	2	77
Pentanucleotide	9	32			9	2	52
Hexanucleotide			3		7		10
Compound			5		9		14
Total general	55	202	20	33	138	181	629

Secondary hit BMr loci identified with Batchprimer3 had 50 % polymorphism, which were distributed in 88 SSR markers. SSRL loci had a 71% polymorphism rate corresponding to 20 SSR markers. Although the highest number of secondary hit derived markers were identified with AMMD, only 17.2% showed polymorphism between G2333 and G19839.

Table 3- 6. Polymorphism level in the primary and secondary hits evaluated in the genotypes G2333 and G19839.

	Primary hits				Secondary hits				Overall
	BP3	SSRL	AMMD	Subtotal	BP3	SSRL	AMMD	Sub-total	Total
Polymorphic	31	11	53	95	88	20	30	138	233
Monomorphic	17	6	79	102	88	8	144	240	342
No amplification	7	3	6	16	26	5	7	38	54
Sub-total	55	20	138	213	202	33	181	416	629
% Polimorphism	64.6	64.7	40.2	48.2	50.0	71.4	17.2	36.5	40.5

Abrev.: BP3=Batchprimer3, SSRL=SSRLocator

BMr polymorphism and repeat type are shown in Table 3-7. Di- nucleotide based SSRs had the highest polymorphism percentage for both primary and secondary hits; a total of 129 BMr loci were polymorphic between G2333 and G19839, amounting to a 46.6% polymorphism rate. Primary hits identified by all three programs were more polymorphic than those identified as secondary hits by the same programs.

Table 3- 7. Summary of polymorphism percentage according with the BMr repeat type.

Motif type	Batchprimer3			SSRlocator			AMMD	
	Primary hit	Secondary hit	Total	Primary hit	Secondary hit	Total	Primary hit	Secondary hit
All BMr Dinucleotide	24	89	113	7	33	40	44	80
Polymorphic	18	49	67	6	20	26	19	17
Polymorphisms %	75.0	55.1	59.3	85.7	60.6	65.0	43.2	21.3
All BMr Trinucleotide	13	57	70	3	-	3	29	97
Polymorphic	7	19	26	1	-	1	6	13
Polymorphisms %	53.8	33.3	37.1	33.3	-	33.3	20.7	13.4
All Others	18	56	74	10	-	10	65	4
Polymorphic	6	20	26	4	-	4	28	-
Polymorphisms %	33.3	35.7	35.1	40.0	-	40.0	43.1	-
Total	55	202	257	20	33	53	138	181

3.2.4 Genetic map

In the present work a genetic map was obtained for the cross G2333 x G19839 covering 2231.75 cM in total accumulated distance. The direction of linkage groups was aligned with the genetic map of Ochoa et al. (2006) and Checa and Blair (2008), who used the same population for genetic mapping.

Out of 298 mapped markers, 155 were for BMr loci. These markers were distributed across all the linkage groups and average marker density was 7.7 cM/marker. Although there were variability in markers densities because of clustering, most regions of the common bean genetic map were equally saturated (Figure 3-2, Table 3.8, Annex 3-2).

The length of linkage groups ranged from 120.5 cM for the linkage group b09 to 411.7 cM for linkage group b04. The length of this latter linkage group was atypically because the average for all other linkage groups was 183.7 cM.

Distortion of the 1:1 segregation ratio expected for markers in the RIL population, was observed in 75 out of 155 markers mapped along the different linkage groups. Overall (62 out of 298), more markers were biased forward G2333 than G19839.

Although 233 BMr markers were shown to be polymorphic, only 194 were amplified in the full RIL population for the cross of G2333 x G19839. Most of the markers (155 BMr) exhibited a high LOD score, with values ranged from 16 to 25. The remaining 39 BMr markers were eliminated for different reasons: six BMr had a LOD score lower than 3, four markers were assigned to two linkage groups, 18 BMr had a good LOD score but their localization in the linkage group inflated the map, with distances upper 15 cM, respect to its nearest marker, thus they were not used for the final genetic map.

Additionally, the majority of the BMr loci from the same BAC contig mapped together. However eleven BMr markers mapped in a linkage group that not correspond with the other markers in the same contig. Where there was a conflicting marker, the majority position was the only considered. For example, the markers BMr398, BMr367, BMr415, and BMr528 from BAC contig number 43 mapped on linkage group b07, while BMr410

from the same contig mapped to linkage group b08, so this marker was removed. In order to validate the position of these markers, a blast procedure with soybean sequence database was done. Soybean genome sequences were downloaded through phytozom webpage (<http://www.phytozome.net/soybean>), in the Gmax_109.fa.gz version. Thus, the soybean database was compared with the BAC-end sequences corresponding to the BMr belonging to conflictive contigs. Blast Parser V1.2 (<http://geneproject.altervista.org>) was used to visualize the blast output and cutoff of e^{-20} were used to limit the hits. According to this criterion, 19 common bean sequences were designed RGH-SSR (or BMr) markers because they showed homology with a soybean sequence. However, data for two or more sequences of the same contig were not obtained. For example, a hit for the sequence PV_GB0017K23 (BMr245) was obtained but there was not information to PV_GB0017E18 (BMr474), which were located in the contigs number 147. Thus, data validation is necessary to confirm the real position of these markers, which could be done by evaluation of markers and comparison of mapping results. Some details of these eleven markers are shown in the Annex 3-3.

The BMr mapped were distributed in 72 contigs and 25 singletons. Most of singletons (56%) mapped in the b04 linkage group and were identified with AMMD program. Almost half of the BMr markers mapped were primary hits. The most common repeat type for BMr mapped loci was dinucleotide (56%), represented firstly by TA or AT motif.

In the B07 linkage group from DOR364 x G19833 RIL population (Córdoba, 2009) were localized 12 of 15 markers evaluated, which to be expected for mapping in this group. It is validating the accuracy of the genetic map generated in this work. However, the markers BM201, BMb502 and BMb191, mapped in the linkage groups B01, B01 and B03 respectively. These markers were genotyped newly in the DOR364 x G19833 population and the results confirm the position of the markers in the linkage groups obtained in this work.

Table 3- 8. BMr distribution within the genetic map derived for G2333 x G19839.

Linkage Group	No. of BMr mapped	Other markers previously mapped	Total number of markers	Genetic length	Distance between markers (cM)
b01	14	8	22	151.57	7.3
b02	9	16	25	195.4	7.8
b03	10	16	26	212.0	8.2
b04	41	21	62	411.7	6.6
b05	8	9	17	126.6	7.4
b06	4	13	17	146.3	8.6
b07	11	22	33	253.6	7.7
b08	11	7	18	149.8	8.3
b09	6	9	15	120.5	8.0
b10	20	11	31	183.1	5.9
b11	21	11	32	281.3	8.8
Total	155	144	298	2231.8	7.7

*Linkage groups containing additional markers evaluated in this work additionally to BMr. b01 (BM201, BMb502), b03 (BMb191), b07 (ATA148, ATA74, BMb1080w, BMb1117w, BMb1142w, BMb1198w, BMb1275w, BMb160, BMb202, BMb489, BMb601, BMb621) and b08 (BMc121).

Figure 3- 2. Common bean linkage map from 86 recombinant inbreeding lines from G2333 x G19839, with 154 BMr. Primary hits are shown as green colour and secondary hit as red colour.

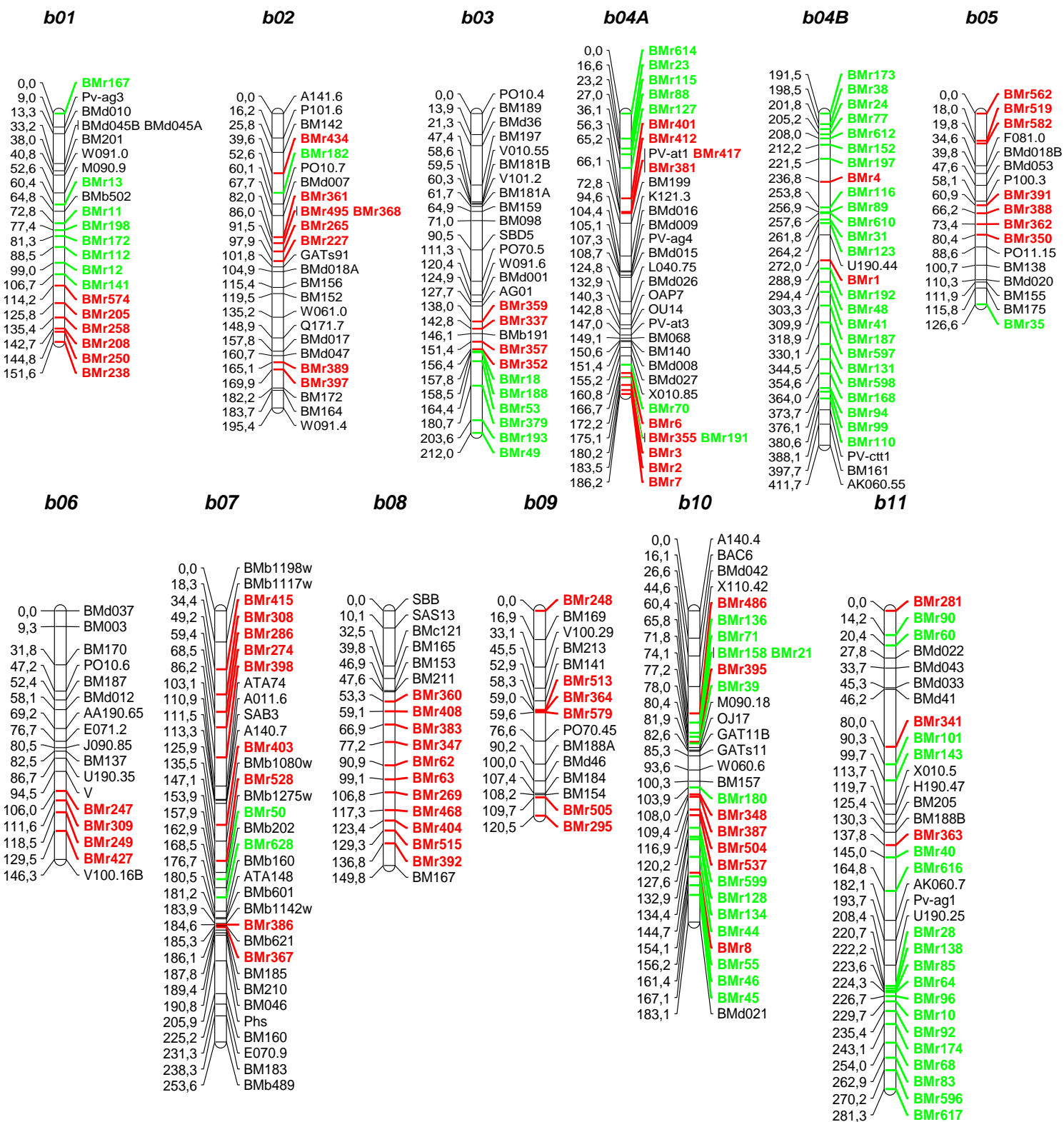


Figure 3-3 shows pairwise recombination fractions for each pair of markers and LOD scores obtained with the using R-QTL. This figure confirms the reliability of the G2333 x G19839 map, developed in this work. There are not conflicts with the position of the markers along all chromosomes, as any red point is outside the main line (red colour mean paris of markers that appearto be linked) and the estimated recombination fraction are smaller for more closely linked markers (Broman, 2009).

Figure 3-4 shows the genetic maps obtained with Mapmaker/Mapdisto (right) and R-QTL (left). In general, there is a good match between two maps. Map expansion is remarkable to b04 where R-QTL give a linkage group with 504.07 cM, this means an expansion of 92.38 cM related to the initial map.

Figure 3- 3. Pairwise recombination fractions (upper left) and LOD scores (lower right) in G2333 x G19839 genetic map.

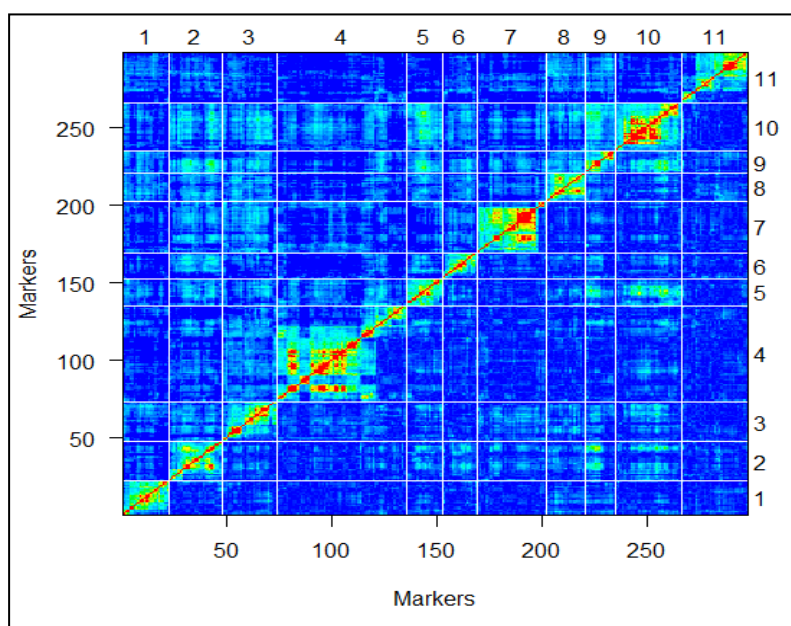
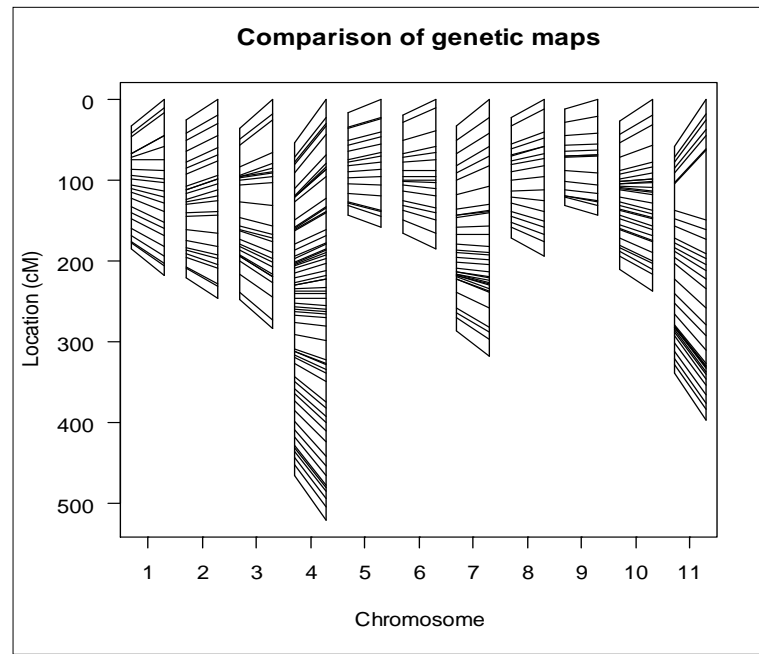


Figure 3-4. Comparison of G2333 x G19839 genetics maps obtained with mapmaker/mapdisto versus R-QTL.



3.3 Discussion

The major results of this study was the identification of RGH probes, the screening of the G19833 BAC library and the mapping of RGH-SSR markers. Probes evaluated in G19833 BAC library, allowed the identification of a high number of clones having sequences related to resistance genes homologues.

In the four hybridization assays where only TIR probes were evaluated, unique positive clones were for the most part identified. For example for filters 1 and 3 all of the positive clones were unique sequences. Meanwhile in the assays 6 to 10, which were done with non-TIR probes, only 22% of the positive clones were unique sequences. The non-TIR sequences appear to have an ancient evolutionary history and are found in both dicotyledonous and monocotyledonous plants. This suggests that these sequences arose before the divergence between these two major plant subgroups (Young, 2000; Cannon et al., 2002). In contrast, the TIR domain sequences have hardly been identified in monocots (Jiang et al., 2005; Tarr and Alexander, 2009).

Our results showed that the hybridization of some probes occurred with more than one BAC clone in the G19833 common bean genomic library. Duplicated genes or closely related sequences could be an explanation for this redundancy in hybridization. Also, one must remember the probes were designed from sequences related to homologues of gene resistance, which represent a large and diverse gene family with many copies distributed throughout the genome (Miller et al., 2008). A higher number of gene duplication events have been developed for non-TIR sequences, which could be the reason for finding most redundant sequences of this type.

A high number of microsatellite markers associated with resistance otherwise known as RGH-SSR or BMr markers (for Bean Microsatellites associated of Resistance), were identified in the positive clones having a BAC-end sequence.

Pseudogenes also were identified. In other studies a large percentage of RGH sequences were pseudogenes. For example, in *Zingiber* 39% of RGCs cloned were defined as non-functional genes or pseudogenes. Likewise, in *Pinus monticola* almost half of the cloned RGHs sequences were pseudogenes (Liu and Ekramoddoullah, 2003).

. Proliferation of pseudogenes results from rapid evolution and recombination in R-gene cluster by which numerous nonfunctional genes also arise, through point mutations, insertions or nucleotide deletions (Young, 2000). Pseudogenes sequences were included in our analysis according to their putative role as reservoirs for variation and their potential for becoming new genes (it may be noted that pseudogenes are also called *potogenes*) (Brosius and Gould, 1992). Additionally some pseudogenes have been reported in *R* paralogs genes suggesting their role in evolution of new specificities by recombination and gene conversion (Michelmore and Meyers, 1998).

The BMr markers complement a set of genomic markers derived from BAC-end sequences tested by Cordoba et al. (2010). In that study the number and quality of microsatellite identified by specific SSR search programs depended on the stringency conditions used for their identification, which in turn determined the amplification efficiency and polymorphism detected by each BES-SSR marker. Likewise, amplification of a marker

depends on characteristics such as GC content, primer length, annealing temperature and in addition, the genetic background of the genotype under evaluation. Some polymorphic markers in a population were found to be monomorphic or not amplified in other crosses. For this reason, it is important do not discard any markers until it is evaluated in the population or genotype of interest. In our case, the degree of polymorphism between G2333 and G19839 was high because of the different genetic background and different gene pools from which these two parents are derived.

The highest number of microsatellites was identified with Batchprimer3 and AMMD programs, although the highest number of polymorphic markers was obtained with SSRlocator (in percentage terms). A high percentage of SSRs identified by all three of the SSRs programs contained dinucleotide repeats represented in the first place by TA/AT motif and secondly by GA/AG motif. AT-rich microsatellites tend to be highly variable and this appears to be notable, especially in legume genomes (Blair et al., 2008). This kind of markers motif have been found to be a useful source of polymorphic markers for mapping and diversity assessment in common bean (Blair et al., 2009).

The population was considered appropriate for mapping because the two parents are contrasting in the resistance response to anthracnose. G2333 is one of the most important sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* because it has four resistance genes *Co-4²*, *Co-5²*, *Co-7* and an unnamed gene (Pastor-Corrales et al., 1994; Young and Kelly, 1996; Balardin et al., 1997). Additionally, G2333 and G19839 are from different gene pools, hence they show contrasting marker alleles at many loci (Ochoa et al., 2006).

In the genetic map G2333 x G19839 previously reported, 149 out of 167 markers (3 EST, 75 RAPDs, 5 SCARs, 82 SSRs, the biochemical marker seed protein phaseolin (Phs), and the morphological marker flower color (V)) evaluated were mapped (Ochoa et al., 2006; Checa and Blair, 2008). This map was expanded by 193 BMr and 16 additional SSR markers evaluated in this study. 298 out of 376 markers were mapped, classified as: 42 RAPD, 8 SCAR, 94 SSR and 155 BMr markers. However, in the current map 19 RAPD markers were removed. This produced improved map robustness, since microsatellites are more reproducible. In addition long distances of over 20 cM in cM which inflate the map length were eliminated by not considering were RAPD marker or SSR. Simultaneously,

SCAR markers were maintained as they were of interest due to their association with disease resistance (Miklas, 2010). All markers were distributed across the eleven linkage groups with an average distance between adjacent loci of 7.7 cM, with a total map coverage of 2231.8 cM.

Some markers amplified double bands, which were confirmed by repeating the amplification and running on polyacrylamide gels so as to discard PCR or banding pattern reading errors. This could have been due to residual heterozygosity in the RIL population. However, heterozygosity in RILs populations is unexpected in advanced generations such as in the G2333 x G19839 population which is in the F7:8 generation. This can be considered an effect of the genetic distance between the parents, because they come from the Mesoamerican and Andean gene pool, respectively.

In addition, segregation distortion was identified, which is a common event identified in different mapping studies. In lentil, distortions from 26.6% to 83.3% have been reported (Tanyolac et al., 2010). In common bean, Hanai et al. (2010), identified distortion in 17.5% of the markers evaluated in the RIL population BAT93 x JaloEEP558. Location of genes favoring meiotic selection or inadvertent selection was the explanation to this distortion. In the Carioca MG x ESAL 686 population, 29 out of 30 polymorphic markers showed distortion toward the Carioca cultivar (Rodrigues and Santos, 2006). This distortion was explained as natural selection.

Segregating distortions seems to be a common feature in RIL populations. In comparison with other types of mapping populations, RIL populations derived from single seed descent have undergone several rounds of meiosis and natural selection during the inbreeding process, resulting in a high proportion of distorted markers (Hausmann et al., 2002; Singh et al., 2007). Additionally, a greater proportion of distortion has been identified for interspecific compared to intraspecific crosses (ref....).

In the case of the G2333 x G19839 population where single seed descent (SSD) was carried out in the field the distortion could have been caused by involuntarily positive selection towards resistant genotypes. Here, susceptible genotypes may not have to reach harvest, as anthracnose can cause losses of up to 100% susceptible genotypes (Guzmán et al., 1979a; b). Shewing towards the more productive climbing beans could

also have occurred since G2333 provides alleles for wide adaptability and higher productivity with up seven seeds per pod. Indeed, Checa and Blair (2008), performed a QTL analysis for yield and climbing ability using the G2333 x G19839 RIL population. Among the variables evaluated by these authors bimodality was observed in the histograms as well as phenotypic shewing towards G2333. Segregation distortion, residual heterozygosity and dominance were the explanations given to this phenomenon.

The value of using the G2333 x G19839 population was high as the number of markers in this population was considerable, and were generally mapped with high LOD value. Markers with an inconsistency were not used for the construction of the map. Although some chromosomes showed a large distance between markers, average distance was 7.7 cM. However, marker distribution was not random. The low density of markers on certain linkage groups may correspond to regions that were highly monomorphic with high frequencies of recombination (Castiglioni et al., 1998). The optimum number of markers in a genetic map varies according to the length and the number of chromosomes in each plant species. Marker density, can affect QTL detection; however Darvasi et al. (1993), reported that the power of detecting a QTL was virtually the same for a marker spacing of 10 cM as for an infinite number of markers, and only slightly decreased for marker spacing of 20 or even 50 cM.

Genetic map quality and realibility is supported by high quality data. It is necessary to use data diagnostics tools to be confident about the realibility of the genetic maps. Programs such as R-QTL have a complete guide to check, identify and correct errors in the data (Broman, 2009). Distortion segregation, marker order, pairwise recombination fractions, ripple order and estimated genetic map, are some of the tools that allow to get more realible genetics maps. Although comparing Mapmaker/Mapdisto and R-QTL genetic maps, there were some differences in the total length of some linkage groups, marker assignment along the eleven chromosomes was the same. This confirms the quality of the genetic map obtained. Some linkage groups showed a map expansion in the map obtained with R-QTL, however marker order was similar. It is critical to check that markers are placed on the correct chromosomes and in the correct order, as the incorrect placement of markers on the map can destroy the results of the QTL analysis (Broman, 2009).

In general terms the average relationship between physical and map distances in the common bean genome was estimated at 530 kb/cM (Vallejos et al., 1992). More recently, the equivalence between cM and Kb was established to four linkage groups (b11, b04, b02 and b08) and the values ranged from 15 Kb/cM to 69 Kb/cM (Cordoba, 2009). These discrepancies are because the relation Kb/cM varies according to different species and also inside the chromosomes, given the recombination frequencies are different (ref...). However, the relatively small size of the common bean genome makes this crop species a good candidate for the isolation of genes via chromosome walking techniques. BMr markers (firstly the identified as primary hit) are associated to specific clones in the G19833 BAC library, which consist of 55,296 clones with an average insert size of 145 Kb (Schlueter et al., 2008). Thus, to get the complete sequence of a specific clone will be a good strategy to identify putative resistance genes, according to the mapping results obtained in this work, at least until the common bean genome is released.

Before this study a total of 17 RGH genes had been mapped in common bean along all linkage groups, except b05, b06 and b09. Of these, eight were associated with QTL for resistance genes against anthracnose, BGYMV, and ALS diseases (López et al., 2003; Miklas et al., 2006). The new BMr markers associated with resistance gene homologues may be an important source of information of location of resistance genes for different pathogens such as fungi, bacteria, oomycetes and viruses. Various studies in which different resistance gene analogs have been used to follow resistance genes in segregating populations, link RGA to R-genes and then ultimately use them as candidates for gene isolation and for marker assisted selection (Godwin, 2003).

A total of 39 BMr were distributed on linkage groups b01, b03, b05, b06, b09, b10 and b11, and based on the R-gene compilation of Miklas et al. (2006), could be associated with resistance to angular leaf spot, bacterial brown spot, common bacterial blight, fusarium root rot, halo blight, leafhopper, trips, web blight and white mold. Additionally some resistance genes to rust, BCMV, anthracnose and the defense-related genes Ch, Lox-1, Pal-1 and PvPR-1 have been identified (Miklas et al., 2006).

The association of BMr markers with R-genes was notably for b02 which is one of the chromosomes with a high number of genes/regions associated with both quantitative and qualitative resistance. A total of 11 QTL linked to resistance to common bacterial blight, halo blight, fusarium root rot, trips, bacterial brown spot, web blight and white mold resistance have been identified, and five major resistance genes are found on in this linkage group (Miklas et al., 2006).

The largest and most saturated chromosome in this study (b04) was of interest because it has been one of the most extensively studied for resistance to anthracnose. The resistance gene cluster in the bottom half of b04 was found to be a complex locus involving resistance to different pathogens, including *Uromyces appendiculatus*, *Pseudomonas syringae* and *C. lindemuthianum* (Geffroy et al., 1999). Sequencing showed this region to be rich in NBS-LRR and to span at least 2.7 cM interval in the vicinity of the *Co-9/Co-y* anthracnose *R* genes (Geffroy et al., 1999; Ferrier-Cana et al., 2003, 2005). The b04 cluster is known to harbor 17 and 12 non-TIR-LRR sequences in BAT93 and JaloEEP558 respectively. Thus, this *R* gene cluster seems to be one of the genetically and molecularly most complex *R* gene loci described in *Phaseolus vulgaris*. López et al. (2003), found three RGA sequences separated from each other on this linkage group, while here mapped a total of 41 BMr and most of them showing clustering.

The identification of markers located on chromosome b07 was one of the main goals, since genes of interest *Co-5* and *Co-6* conferring resistance to anthracnose are found there. In this group we added 11 BMr and 12 microsatellite markers, for a total of 33 markers, with an average distance of 8.8 cM. QTL conferring resistance to common bacterial blight, ascochyta, BCTV (Beet curly top virus) and BCMV have been identified in this chromosome (Miklas et al., 2006). Additionally one RGA was mapped to this group (López et al., 2003).

Meanwhile linkage group b08 is known to carry the *Co-4* locus, which as the *Co-4²* allele gives the widest spectrum of resistance to anthracnose. In addition, the linkage group contains QTL for resistance to common bacterial blight, white mold, web blight, trips and major resistance genes to rust and angular leaf spot, have been identified. Additionally,

two RGAs have been mapped in the telomeric b08 region (López et al., 2003). Meanwhile in the present study, eleven BMr were mapped to this linkage group.

The distribution of BMr markers on linkage groups b01, b03, b04, b06, b08, b10 and b11 tended to be towards the ends of the corresponding linkage groups. In the genome of common bean, many *R* genes are clustered at complex loci located in the telomeric regions, rather than in centromeric regions (Vallejos et al., 2006; Geffroy, et al., 2008). Ectopic recombination in subtelomeric regions of non-homologous chromosomes has been suggest as a frequent event in common bean (Perrine et al., 2009). This would be an important evolutionary mechanism for evolution of disease resistance genes.

In the distribution of markers along the chromosomes, the clustering of BMr markers was also evident. For example, most of BMr equivalent to primary hits that were mapped to linkage group b04 were grouped into a major cluster. The same pattern was observed on linkage groups b01, b03 and b11. The differential grouping between primary and secondary hits was also identified for each linkage group. Using the NBS-profiling strategy 32 putative RGA mapped at in the RIL population BAT93 x JaloEEP558 and co-localization and clustering of some RGAs also was observed (Hanai et al., 2010). Fourteen disease-resistance related sequences were identified and grouped in eight microclusters, which were mapped on four linkage group in the population Calima x Jamapa (76 lines F8, obtained by SSD) (Rivkin et al., 1999). This kind of arrangement could favor events of unequal crossing over and/or gene conversion, which can give rise to new disease resistance gene specificities (Perrine et al., 2009).

The BMr clustering is related to arrangement in families of the most characterized *R* genes as tightly linked genes (Leister, 2004; Geffroy et al., 2009). Clusters of *R*-genes can harbor different specificities to different pathogens (Cooley et al., 2000).

Comparative mapping studies of monocot RGAs, have suggested that *R* genes diverge more rapidly than the rest of the genome (Leister et al., 1998). In Arabidopsis and rice, the resistance genes are physically close to each other (Hulbert et al., 2001; Monosi et al., 2004). Most of the NBS-LRR sequences of Arabidopsis form cluster, and only 26.8% of these genes are distributed as singletons (Meyers et al., 2003).

In common bean at least three major cluster with difference specificities to disease resistance have been identified at the Co-2, I, and B4 loci (Geffroy et al., 1999, 2000, 2009; Miklas et al., 2006; Vallejos et al., 2006).

Co-2 mapped on b11 linkage group, represents a good example of a R-gene cluster for anthracnose resistance genes. The fragment amplified by the RAPD marker ROH20 linked to this gene was cloned and sequences with leucine rich repeats (LLR) were identified (Geffroy et al., 1998). Additionally several QTL for *C. lindemuthianum* were identified in this cluster, suggesting that the Co-2 locus is a highly complex locus, probably harboring various genes involved in disease resistance (Geffroy et al., 1998). In this study, 12 out of 21 BMr markers (58%) mapped in the telomeric region of this linkage group and could correspond to Co-2 locus sequence.

The locus I is on linkage group b02 and controls resistance to Bean common mosaic virus (BCMV), a member of the Potyviridae family and also an important resistance gene against BCMV, BICMV, CAMV, SMV and WMV viruses. Thus, it has also been the focus of positional gene cloning research (Vallejos et al., 2006). A total of 11 BMr mapped in this linkage group, could be evaluated in order to identified if there is a marker more linked with the I resistance gene.

At the end of the linkage group b04 there is a complex R gene cluster known as B4. This R-gene cluster comprises RGA sequences of NBS-LRR type with five qualitative resistance genes, three of Mesoamerican origin (Co-9 and Co-7 allelic to Co-3) and two from Andean origin (Co-y and Co-z). In addition three QTL for resistance to *C. lindemuthianum* are found at the end of b04 (Geffroy et al., 1999, 2000, 2009; Miklas et al., 2006). An ectopic recombination event in subtelomeric regions between the chromosomes b04 and b11 was identified. The B4 cluster was apparently derived from CNL sequences in the Co-2 cluster (Perrine et al., 2009). In the present work the most saturated and longer linkage group was b04. Most of the BMr markers (32 markers-78%) mapped at the telomeric region of this linkage group. Since this cluster contains both Andean and Mesoamerican resistance specificities, the sequences in the B4 cluster in common bean cluster could have originated from a common ancestor of the two gene pools. While after

the geographical separation of wild common beans, this cluster has evolved independently in the two gene pools.

3.4 Conclusions

Isolation and mapping of genome-wide resistance (R) gene homologues (RGHs) is of importance in identifying candidate(s) for a particular resistance gene/QTL. Locating and mapping additional NBS-LRR homologues as well as the analyses of the RGHs mapped so far will help to accelerate the identification of genomic regions containing functional resistance genes and facilitate the long process of map-based cloning.

The identification of RGH-SSR and their map location in the genome are good starting points for the identification of R-gene cluster and regions associated with resistance. Phenotypic evaluations should be included for analysis and genetic mapping studies, using a large number of markers associated with resistance gene homologues, so as to have a better evaluation of the regions that control resistance to different pathogens.

BMr identified are useful not only to identify markers or regions linked to resistance to anthracnose but to rust and angular leaf spot, since it would be expected to have contrasting responses between isolates belonging to different geographical origins.

The BMr based map can be a great contribution to the study of characteristics of interest and the results can be easily transferred to indeterminate growth habit common bean programs.

Annex 3- 1.BMr evaluated in the genotypes G2333 and G19839.

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr1	BMb132	Batchprimer3	PV_GBa0037H03.r	Secondary hit	ATCCGTGTTTGTATTGGAA	TTGACACATTGGAAGAAACA	P	AT	183
BMr2	BMb133	Batchprimer3	PV_GBa0095A15.r	Secondary hit	ACCTCTGAGGGAGAAGATGT	GATAAATGTGTGAATGCCCT	P	AT	238
BMr3	BMb134	Batchprimer3	PV_GBa0064J01.r	Secondary hit	TTGTCATGGCTTCACTATCA	TGTTCCCTATTAACATTGCAAT	P	ATTG	107
BMr4	BMb135	Batchprimer3	PV_GBa0062B23.r	Secondary hit	TCTTTACTTTCCAGTGCCAT	GTGAAGCTGAACAGGAGAAG	P	CT	190
BMr5	BMb136	Batchprimer3	PV_GBa0117G05.f	Secondary hit	GGCAACTTATTTGGTAAACG	TGTTTGTTTCATTCTTGATTTT	NA	GA	210
BMr6	BMb137	Batchprimer3	PV_GBa0004E10.f	Secondary hit	GGAGAGTAAATTGAAAGCGA	ATGAGTAGCAATTGGCAAT	P	TAA	276
BMr7	BMb138	Batchprimer3	PV_GBa0125G22.f	Secondary hit	GATCGAGGTGAGTTAGCTTG	TGCAGTCTACATTCAATCCA	P	TGAGT	219
BMr8	BMb167	Batchprimer3	PV_GBa0002B13.f	Secondary hit	TCTCTCACTCATCACACCAA	AAAGTTCGTAATCATTAGCAA	P	AAT	192
BMr9	BMb168	Batchprimer3	PV_GBa0074A05.f	Primary hit	ATGTTTGTTGTAATTTGGTT	GGATATTATACCCACACCC	NA	AT	103
BMr10	BMb173	Batchprimer3	PV_GBa0016P21.r	Primary hit	TAAACGAGTCATTCTCACC	AGCAAAGATGTCAAGTTTCA	P	AT	162
BMr11	BMb306	Batchprimer3	PV_GBa0091F12.r	Primary hit	CCCATACAAACACTCTCGAT	CCCTTTCTCTTGCTGTCTG	P	AGA	295
BMr12	BMb307	Batchprimer3	PV_GBa0074I11.r	Primary hit	TTGTTGCTGACTGAAGGTG	TAATCCGTTGTTGGATTACC	P	GTG	141
BMr13	BMb308	Batchprimer3	PV_GBa0083P16.r	Primary hit	GCCTATCCATTTGTTAACCTT	TGGCACACAAATCATGTAGT	P	TA	170
BMr14	BMb330	Batchprimer3	PV_GBa0067Q24.r	Primary hit	CGGAATGGGAAATTAGGT	TGTTGTAGAAATGAAATGAAA	M	AATTT	282
BMr15	BMb331	Batchprimer3	PV_GBa0100P05.r	Primary hit	GTGGCTGTTGTACTCCATTT	AGTTAAGTGGTGTGTCGCTT	NA	TTCTT	313
BMr16	BMb332	Batchprimer3	PV_GBa0003E05.f	Primary hit	AATTTTCATTTCTTCTACAACA	AAGTTAGAAGGGATGATGAGG	M	ATTTA	209
BMr17	BMb333	Batchprimer3	PV_GBa0125A21.f	Primary hit	TGATTACTGTTGCTTCGATCT	ATGCAAGGGTTGTATATTGG	M	TTATT	163
BMr18	BMb348	Batchprimer3	PV_GBa0056H11.f	Primary hit	CTTCTATTTGGGTTTCTTAGTCA	AGACACTTGAACCTCGGTCAC	P	AAAT	148
BMr19	BMb349	Batchprimer3	PV_GBa0012H20.f	Secondary hit	TCAGTAAGAAAGGAGGACGA	TCGTCCATCTTCAAGGTTAG	NA	AGA	269
BMr20	BMb350	Batchprimer3	PV_GBa0122H20.f	Primary hit	TTTCAATTAACCCACAGTTT	AAGATTGGATGGTTAGGGAT	M	TTTA	120
BMr21	BMb414	Batchprimer3	PV_GBa0032P15.f	Primary hit	AACGACCATTTCGTAGAAAGA	GCTCACAAATACGTCGTAGG	P	CTT	218
BMr22	BMb437	Batchprimer3	PV_GBa0052I10.f	Primary hit	CTCCAGAGTGCTCAATTCTC	GCTTCAGAACCTTGAAGATG	M	AAG	236
BMr23	BMb488	Batchprimer3	PV_GBa0088O15.f	Primary hit	TTGCTTATTGTTTCCGATTT	AAGCCTTGCAAAGAGTTAAA	P	AT	236
BMr24	BMb540	Batchprimer3	PV_GBa0031L15.f	Primary hit	ATTTGGGACAGAATGTGAAG	AATGAGCTTTGAGTGGCTAA	P	GT	288
BMr25	BMb572	Batchprimer3	PV_GBa0078G03.r	Primary hit	GCAGTTGCCTAATTTAGAGTG	TCCGATATGATCCGTTATTC	M	ATC	142
BMr26	BMb614	Batchprimer3	PV_GBa0013K02.f	Primary hit	CCTCTTGAACCTTTGGCACTA	GAAGGTGGAAGATCAATGAA	NA	AT	272
BMr27	BMb616	Batchprimer3	PV_GBa0005L11.r	Primary hit	CCGTATTGTGTGAATCAGTG	ATCGTTTCGTATCGTGAATC	M	AT	204
BMr28	BMb619	Batchprimer3	PV_GBa0070A17.r	Primary hit	GATGGACACACTCACAAACA	TGTGTTCTACCACCAACAGA	P	AT	298
BMr29	BMb783s	Batchprimer3	PV_GBa0080D06.f	Primary hit	TTTAGCTCAAGCTAGCGAAT	ATACAGGAAATAAAGGTTTACA	NA	ATTT	174
BMr30	BMb839s	Batchprimer3	PV_GBa0110A03.f	Primary hit	TGACAAGTGTTATGCAATCTTT	GGATACATAGGCACGTCAGT	NA	ATAAA	268
BMr31	BMb1823w	AMMD	PV_GBa0102P10.f	Primary hit	GTCACACTTTATCGACAACACTAC	CCAAACACTTTGTCTTCTAC	P	AT	334
BMr32	BMb2131w	AMMD	PV_GBa0119P06.r	Secondary hit	CACACACAAACTCTACCAC	TTCATAGAAAGCATAGAAAGAA	M	TC	392
BMr33	NA	Batchprimer3	PV_GBa0002Q19.f	Primary hit	GTGAAAGCCAAATAAATCCA	TCATGCACTCTTCTCCTCT	M	AAAAG	363
BMr34	NA	Batchprimer3	PV_GBa0003E05.f	Primary hit	AATTTTCATTTCTTCTACAACA	AAGTTAGAAGGGATGATGAGG	M	ATTTA	209
BMr35	NA	Batchprimer3	PV_GBa0015B23.f	Primary hit	CGTTGATAATTTGATGACCA	AATAAATTCGCCAAACGAA	P	ATA	388
BMr36	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016K01.f	Primary hit	AAATGTAACATAATGGGTGGG	GATGTCAATTGTCCTCATCC	M	AT	348
BMr37	NA	Batchprimer3	PV_GBa0017F21.f	Primary hit	GGTTCCAATTCTCCACAATA	TTTAATTTTCATGCTGAGTTG	M	AATTT	396
BMr38	NA	Batchprimer3	PV_GBa0031L15.f	Primary hit	ATTTGGGACAGAATGTGAAG	CCAGTATACACCCACACACA	P	AT	263
BMr39	NA	Batchprimer3	PV_GBa0032P15.f	Primary hit	AACGACCATTTCGTAGAAAGA	TACGTCGTAGGTGTCTGTTG	P	TC	209
BMr40	NA	Batchprimer3	PV_GBa0036I08.f	Primary hit	CCGTATTGTGTGAATCAGTG	ATGGGTGGAAGAAAGGTTAT	P	AT	332

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr41	NA	Batchprimer3	PV_GBa0044L20.f	Primary hit	CTAAGACCTCAAACCATTGC	AACCTCGATGCACATTTAGT	P	AT	319
BMr42	NA	Batchprimer3	PV_GBa0062B14.f	Primary hit	CTGGTAGGACTAATGTTCCG	AGGCTGACATCTCAAGTGAC	M	AT	384
BMr43	NA	Batchprimer3	PV_GBa0080D06.f	Primary hit	TGAATCGAATGAGATGTTGA	AAGGTTTACACCCTTTATAAGAA	M	AATA	396
BMr44	NA	Batchprimer3	PV_GBa0083I23.f	Primary hit	GGCTAAGCCAACACATATCA	TTTCGAAGAGACTAAATATCCC	P	AAAT	394
BMr45	NA	Batchprimer3	PV_GBa0086D13.f	Primary hit	CCTCATTGATGGACAAACAT	ATTCTTGGTAGGGATTGTT	P	TTTA	311
BMr46	NA	Batchprimer3	PV_GBa0086D13.f	Primary hit	AGTTTCACATTGAATACGGG	TTCAAAGATTGGATGGTTAGA	P	TTAT	332
BMr47	NA	Batchprimer3	PV_GBa0091M16.f	Secondary hit	ACACCAACCACTGTAACCAT	AATGAAATCTGTGGCTCAAC	M	GAA	357
BMr48	NA	Batchprimer3	PV_GBa0093K15.f	Primary hit	ACGTGTTTGTTATTGGAAGC	CGAATAAATGGAAATCCAAG	P	TA	364
BMr49	NA	Batchprimer3	PV_GBa0105L24.f	Primary hit	TGATTGGACTTGTTCTATGC	CGATGTCAACGACAATCTAA	P	TA	335
BMr50	NA	Batchprimer3	PV_GBa0106H04.f	Primary hit	GTGTGTGTTCTTGAAGGGTT	TTTCGCAAAATTGAAAGTG	p	TTC	354
BMr51	NA	Batchprimer3	PV_GBa0111J22.f	Primary hit	CAAGGTTCTTCAATAACCA	TGTTGGAAGTGGATAGGACT	P	TTA	325
BMr52	NA	Batchprimer3	PV_GBa0114E24.f	Primary hit	ACCATTACACCAAGTTAAGTTT	CCTGTGTTCCCGCTAGTAT	NA	ATT	325
BMr53	NA	Batchprimer3	PV_GBa0115B06.f	Primary hit	AACCTCTTTGCTCGTCATAA	TGAGGCAAGTGTGTCTATG	P	AT	264
BMr54	NA	Batchprimer3	PV_GBa0117G05.f	Secondary hit	GGGAAGGAAATTAAAGGAGA	CGTTTACCAATAAGTTGCC	NA	AAT	210
BMr55	NA	Batchprimer3	PV_GBa0122H20.f	Primary hit	TTGAATACGGGTGAGAAAGT	AAGATTGGATGGTTAGGGAT	P	TTAT	320
BMr56	NA	Batchprimer3	PV_GBa0125L13.f	Secondary hit	TAAGCACCAAAATCACATTCA	TAAGAGACTCCTCTGCCTTG	M	CTT	324
BMr57	NA	Batchprimer3	PV_GBa0012E17.r	Secondary hit	AGTCACAGTTGAATTTTCATGTT	CCACACCCAGTGAATTAGAT	M	TA	380
BMr58	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016E13.r	Secondary hit	AAGACGAAGATGAAGCTCG	TGTTGTAGAAATGAAATGAAA	M	AATTT	305
BMr59	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016E13.r	Secondary hit	AATTTTCATTTCTACAACA	AACCGTAGTCCATTGTCAAG	M	ATTTA	369
BMr60	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016K01.r	Primary hit	AACATACCCTATCCCTTGGT	CATTGTCTACCAACCACTA	P	GGT	307
BMr61	NA	Batchprimer3	PV_GBa0024A10.r	Primary hit	TTCTTGAAGGTATGGTGTC	GCGGTATATCAGTTTGTGTT	M	TTG	355
BMr62	NA	Batchprimer3	PV_GBa0026L23.r	Secondary hit	ATTCACCAGATCTCATCCA	TGATTTATTGGGAATTGAAA	P	AAT	349
BMr63	NA	Batchprimer3	PV_GBa0026L23.r	Secondary hit	TTCAATTCCCAATAAACTCAA	ACGAGGAATGTCTACACCAG	P	TA	301
BMr64	NA	Batchprimer3	PV_GBa0031K21.r	Primary hit	CAGTGCAAGTTGTTGAAAGA	AAGTGCCATTATGAAGTCT	P	AT	400
BMr65	NA	Batchprimer3	PV_GBa0038I05.r	Primary hit	TGATGCACACTTTAAAGAATAA	TTTAAGGAAGATAGAGTGAAAGA	NA	TTA	355
BMr66	NA	Batchprimer3	PV_GBa0063D16.r	Secondary hit	TCATGCACTCTTCTCCTCT	GTGAAAGCCAAATAAATCCA	M	TTTTT	363
BMr67	NA	Batchprimer3	PV_GBa0064J01.r	Secondary hit	ATTTCAATTTCTACGCATGG	TGATAGTGAAGCCATGACAA	M	AATA	357
BMr68	NA	Batchprimer3	PV_GBa0076P05.r	Primary hit	TTATGAAACATGGAGGGATT	TAAAGCCCACTAACCACACT	p	TA	336
BMr69	NA	Batchprimer3	PV_GBa0085A19.r	Primary hit	AGAGCCAAGCTCTCTTAGGT	TGCATTGTTAGAGTTTACGG	M	TAT	332
BMr70	NA	Batchprimer3	PV_GBa0086E14.r	Primary hit	GGGATATGAAACCATCAAAAT	TTCCAAAGGTTTATTCCAAA	P	AT	343
BMr71	NA	Batchprimer3	PV_GBa0094F13.r	Primary hit	GAGATGTCTTCATTAATGGTGT	ACGATTTGATCCTAGGCTTT	P	TATT	382
BMr72	NA	Batchprimer3	PV_GBa0097P21.r	Primary hit	CCATGAAGGGAGAATGTAAA	GGGCTCATACAATCAACACT	P	AT	317
BMr73	NA	Batchprimer3	PV_GBa0098B02.r	Secondary hit	AGGACTAGAACTCTGATTTTCAT	GGCCGGAACAGTAACTAATA	M	ATA	371
BMr74	NA	Batchprimer3	PV_GBa0100P05.r	Primary hit	AGTTAAGCGACACACCACTT	CACCTAGCTGTTAGCATGTTT	M	ACAAA	151
BMr75	NA	Batchprimer3	PV_GBa0104C16.r	Secondary hit	TATCGTGCCTTTAAGAAAGC	ATGAGTAGCAATTTGGCAAT	M	TAA	368
BMr76	NA	Batchprimer3	PV_GBa0118H21.r	Primary hit	ATTTGCCTTCTGTCTCCATT	CCATGACTTGTCTTATGGT	M	TA	335
BMr77	NA	Batchprimer3	PV_GBa0118H21.r	Primary hit	AGGACAAGTCATGGAAATTG	AAGGTGATGATGTTACAGCC	P	TA	346
BMr78	NA	Batchprimer3	PV_GBa0125C03.r	Secondary hit	TGTGAGTGAAGAGATAGATGTGA	GATGATTTACTGTTTGTGGAAA	M	TTA	399
BMr79	Bmb2176w	AMMD	PV_GBa0001H22.r	Primary hit	TACGGGGGAATTCTAAAAGC	GTGTCTACCAATTTACCATAG	M	TA	342
BMr80	Bmb2177w	AMMD	PV_GBa0002D04.f	Primary hit	TAGAACACACTCATAAGTCTCC	CTCTTTAAGCATCTATCAGC	NA	GAAA	295
BMr81	Bmb2178w	AMMD	PV_GBa0004L21.f	Primary hit	GTTGCACCTAAAATGGTC	CATCTCTGAAGATCCTACAA	M	TG	231
BMr82	Bmb2179w	AMMD	PV_GBa0007N07.f	Primary hit	AAGGAGATTCTGCAATGG	ACTCTGTATCTAAGGAACCTGT	M	GTGA	280
BMr83	Bmb2180w	AMMD	PV_GBa0010F04.f	Primary hit	GTGGTACTATCCAATCACAG	ACTGAACCCACATAGTGAGT	P	ACAT	251

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr84	BMb2181w	AMMD	PV_GBa0010L18.r	Primary hit	TAGACGAGTGTGTCTATGAAC	GGTTCAGTGAAGTGTGAGAA	M	AAG	277
BMr85	BMb2182w	AMMD	PV_GBa0014G22.r	Primary hit	TATAAGTTGGATCACCCCTA	GAGAGTGGAGATTGAGTATATG	P	ATCTGG	206
BMr86	BMb2183w	AMMD	PV_GBa0015E10.r	Primary hit	GGTTAGCACAGATAAACAGT	CTAGATGAACAGATTGAAGC	M	AGAA	346
BMr87	BMb2184w	AMMD	PV_GBa0015O22.f	Primary hit	GTTTGGATTACTGTGATGTC	AGGTCAAGGTTATCTAGTAGTG	M	TCAC	354
BMr88	BMb2185w	AMMD	PV_GBa0016J14.r	Primary hit	GCCTGGACTTATTTAGTTACTC	CTGCATATAAAGTCATCCAG	P	Composed	325
BMr89	BMb2186w	AMMD	PV_GBa0016J14.r	Primary hit	CTCATCCTCAGATAACAGAA	TAAGTCCAGGCCAACTACTA	P	TC	217
BMr90	BMb2187w	AMMD	PV_GBa0016K01.f	Primary hit	AACTTCAGGGGAGTGTTA	GTCTCATCCTATCTATGACTA	P	AT	355
BMr91	BMb2188w	AMMD	PV_GBa0016K01.r	Primary hit	TGGTGGTCAAGATATGATAG	GTCATCTCTATTGTGCAACT	P	GGT	330
BMr92	BMb2189w	AMMD	PV_GBa0016P21.r	Primary hit	CGACTATGACTAAACGAGTC	AGATGTGAGTCTAGCAAAGA	P	Composed	184
BMr93	BMb2190w	AMMD	PV_GBa0019L10.f	Primary hit	CTATAAAAGCAGGGCTTAG	CACTCAAGATGAGACTAGGA	M	TGAG	125
BMr94	BMb2191w	AMMD	PV_GBa0020B19.r	Primary hit	AAGACAACGTAGTGACGAT	GACCAACACCATCTATCAT	P	TTGTT	221
BMr95	BMb2192w	AMMD	PV_GBa0022K02.f	Primary hit	TTTACCAGGGTTCTGTTAC	GTCGTGATTTTCTTGATGTG	P	TATT	232
BMr96	BMb2193w	AMMD	PV_GBa0022N05.r	Primary hit	AGTAGGGGATTTGTATTCTG	GTGGTGAGCTAGAGATTAAA	P	TTTAT	366
BMr97	BMb2194w	AMMD	PV_GBa0024D24.f	Primary hit	AAAGAGGACAAGATTCTCAG	GTGTAGTCTATTAAGGAGTGGT	M	CACC	400
BMr98	BMb2195w	AMMD	PV_GBa0024G23.r	Primary hit	CAAGTACTAAAGAGTTGTGCAG	CATTTATCACGAAGTGGTAG	M	AGG	100
BMr99	BMb2196w	AMMD	PV_GBa0024J11.r	Primary hit	GACCATTCGTAGAAAAGAA	CATAGTTCTGTGAGAAGACAAC	P	Composed	388
BMr100	BMb2197w	AMMD	PV_GBa0025B10.r	Primary hit	CACTATCAATCTCTACACCAC	CTGTGGTAGAGTAAAATAGACC	M	AAAAG	133
BMr101	BMb2198w	AMMD	PV_GBa0025M18.r	Primary hit	CACACGTTAGTTTCTAGTTCAC	GAACATCACCATTCCTTC	P	Composed	395
BMr102	BMb2199w	AMMD	PV_GBa0026F23.r	Primary hit	AGTGTAGTGTAGGGTTGAGTAT	GATTCAGAGTTCAGAGTTGA	P	AACAG	296
BMr103	BMb2200w	AMMD	PV_GBa0027C14.f	Primary hit	GTGAATCCACTTCTAACAGA	GAGAGTGTATGAGAGGAAGAAT	M	Composed	166
BMr104	BMb2201w	AMMD	PV_GBa0027N20.f	Primary hit	CTAGAAGTTGCTTGGAAAG	TACCACATAGGCATCAATAC	M	TTGT	366
BMr105	BMb2202w	AMMD	PV_GBa0029C13.r	Primary hit	CACCAACTCAATCTCTACAC	CTGTCGTAGAGTAAAATAGACC	M	AAAAG	137
BMr106	BMb2203w	AMMD	PV_GBa0030G07.r	Primary hit	GTTATTAGGGTGTGAACTC	GAAAGTAGGTTGATCCTGTA	M	TAAAAA	355
BMr107	BMb2204w	AMMD	PV_GBa0030L17.r	Primary hit	GTTGTAGGGGACTATCTCTTAT	CACCTTTAGGATTGTACTGA	M	TTTA	230
BMr108	BMb2205w	AMMD	PV_GBa0032E13.f	Primary hit	CTCTCATGTACTGTTTGGTT	GTCAGTGTGATCCTTATTAGG	NA	AC	382
BMr109	BMb2206w	AMMD	PV_GBa0032L12.f	Primary hit	CTCTTCCAAAGCCATTAG	GTCAAGTAGTCAAGTTTAGAGG	M	TTAT	381
BMr110	BMb2207w	AMMD	PV_GBa0032N14.f	Primary hit	CTCTAACCCCTGCTCATTT	GCTATGGTGTGTTGTAGAT	P	TTCA	150
BMr111	BMb2208w	AMMD	PV_GBa0036L21.f	Primary hit	GCTTCATCACACTCTTACAC	CCTAAAGTTTCTTACCCTTC	M	Composed	384
BMr112	BMb2209w	AMMD	PV_GBa0036M15.r	Primary hit	AGTGACAGGAGAAGATAGACT	CCTTACTAGTCTGTTTTGTAGG	P	Composed	327
BMr113	BMb2210w	AMMD	PV_GBa0038L17.r	Primary hit	GTTGAAAGCAGGTTCTACTA	GTATCTGACCCATACAACCTG	M	ACACG	326
BMr114	BMb2211w	AMMD	PV_GBa0041G09.f	Primary hit	CCTCACTTAGTCTTATCTTGAG	GAAGTAAAGATGAACGGTAG	M	CTTC	254
BMr115	BMb2212w	AMMD	PV_GBa0042A14.f	Primary hit	CTGCATATAAAGTCATCCAG	GCCTGGACTTATTTAGTTACTC	P	Composed	325
BMr116	BMb2213w	AMMD	PV_GBa0042A14.f	Primary hit	TAAGTCCAGGCAAACTACTA	CTCATCCTCAGATAACAGAA	P	GA	217
BMr117	BMb2214w	AMMD	PV_GBa0042A14.r	Primary hit	TACCCAAAGGACTATAAGTG	GGAGAAGTTTGACTTTGACT	M	AAAG	166
BMr118	BMb2215w	AMMD	PV_GBa0042E09.r	Primary hit	TACATCTTCTACCATGTTT	CACTTAACAGGAGAAATCAG	M	CTT	240
BMr119	BMb2216w	AMMD	PV_GBa0043M16.f	Primary hit	CACTTCTTTCTTCCACACT	CTGTTTATGGGTAGATGATG	M	AC	377
BMr120	BMb2217w	AMMD	PV_GBa0044C12.r	Primary hit	ACTTCTTTGTAAAGGGAGAG	TCTACCTCTTTGAGATGACA	M	CAAA	176
BMr121	BMb2218w	AMMD	PV_GBa0045O13.r	Primary hit	GTTTGGTAGAGCAATGAGTA	GCTGTGGTTTATATGGTAAG	M	ATTTT	365
BMr122	BMb2219w	AMMD	PV_GBa0047C17.f	Primary hit	GTTTGGATTACTGTGATGTC	GGTATGTGTTGATATTGACC	M	TCAC	248
BMr123	BMb2220w	AMMD	PV_GBa0047G02.r	Primary hit	ACAGCAGTAGAGAACAAAAG	CTACAAGGTGTGATCAGATT	P	TTTTCT	150
BMr124	BMb2221w	AMMD	PV_GBa0047O11.f	Primary hit	CTAGGAGATTCCAAGAGAAGTA	GTATCTAACCATAGGCATAACC	M	TG	252
BMr125	BMb2222w	AMMD	PV_GBa0051E23.f	Primary hit	GGTTATGTACCTTCACTGTATC	AGTTAAGAAGGTTGGTGAAC	P	TCAT	114
BMr126	BMb2223w	AMMD	PV_GBa0052J20.f	Primary hit	AATAGCTGATGTATGGAGTG	AATCTTCTCCTCCAAGAAC	P	AGAA	100

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr127	BMb2224w	AMMD	PV_GBa0052J20.f	Primary hit	GTTCTTGGAGGAGAAGATT	TAAACTCAAGTCGTATCACC	P	ATTT	386
BMr128	BMb2225w	AMMD	PV_GBa0052J21.f	Primary hit	CTAGAGTCTTCCATTGCATA	GAAGAGCAAAGTGAATAGTG	P	CTTCAT	107
BMr129	BMb2226w	AMMD	PV_GBa0052O06.r	Primary hit	ATACTCGAAGATCTCACTCTC	GACACATGTAGTTTAGAGTTCC	P	CCTT	249
BMr130	BMb2227w	AMMD	PV_GBa0054C24.f	Primary hit	CTTGGATCATCTTAAGGAGT	GTATATCCATTCTCTTGATGG	M	AC	391
BMr131	BMb2228w	AMMD	PV_GBa0055F06.f	Primary hit	TATCATGGTACACTGCTACA	GTAGAGGTTCTGAAAGTAGGA	P	GTGA	392
BMr132	BMb2229w	AMMD	PV_GBa0055F09.f	Primary hit	CCCCTCTCTTCTTTTGTAT	AAGAGTAGACCTACCTCATTTT	M	CTTT	131
BMr133	BMb2230w	AMMD	PV_GBa0057J09.f	Primary hit	AGAGGAGATAACTAACCAACC	CTTACTTTGGTTACAAGCTC	P	CTTT	321
BMr134	BMb2231w	AMMD	PV_GBa0058P09.f	Primary hit	GTGAAGAGGAAAGCTAGAAT	ACCAGAGACACAAATAACG	P	GAAAGA	186
BMr135	BMb2232w	AMMD	PV_GBa0059E19.r	Primary hit	TACCAGTCTTGTCTGCTACTA	GAATGAGGGTTTAGATAGGT	M	CACT	319
BMr136	BMb2233w	AMMD	PV_GBa0060L09.f	Primary hit	GACCATTCTGTAGAAAAGAAG	CATAGTTCTGTGAGAAGACAAC	P	TC	388
BMr137	BMb2234w	AMMD	PV_GBa0063K14.r	Primary hit	AGAGGAGATAACTAACCAACC	CTTACTTTGGTTACAAGCTC	P	CTTT	321
BMr138	BMb2235w	AMMD	PV_GBa0070A17.r	Primary hit	GAAATATGATGGACACACTC	CACCAACAGATATCATCACT	P	TC	295
BMr139	BMb2236w	AMMD	PV_GBa0070G13.r	Primary hit	AGTATTATCTGGGTTGGAGT	GTTCAACCATCATGTTTTG	M	GTGGAC	135
BMr140	BMb2237w	AMMD	PV_GBa0070M18.f	Primary hit	CTTTTCTACTCTACACCTATC	GAGAGTCAAGTAAAGGAGGT	M	CTTGGG	320
BMr141	BMb2238w	AMMD	PV_GBa0074I11.f	Primary hit	GTACCGGCAAGTAGATTT	GTTAGAAACTCACTCACCAA	P	ACA	287
BMr142	BMb2239w	AMMD	PV_GBa0077H10.r	Primary hit	TCACTTCTTCTCAACCTCTA	AAGTCATCAGAAACACACAC	M	ATG	396
BMr143	BMb2240w	AMMD	PV_GBa0078L11.f	Primary hit	ATGAGATCTACCACACATACAC	CTTCCCACATTACAACATAG	P	ATTTT	142
BMr144	BMb2241w	AMMD	PV_GBa0080M17.r	Primary hit	GTGCTAACATTGAAGACATC	TTACTCTCTTTGTTGCTCAC	M	ATTT	269
BMr145	BMb2242w	AMMD	PV_GBa0082M19.f	Primary hit	GGTGTCAAATTACCTACTAGC	TACCATATTTACCCGTGAG	M	TAAA	338
BMr146	BMb2243w	AMMD	PV_GBa0083K01.f	Primary hit	GTCCATATAAACCTGTGTGTCT	GACTACAACATTGGAACCTA	M	GGT	391
BMr147	BMb2244w	AMMD	PV_GBa0083M04.f	Primary hit	CAATGGCTACCAATGAAG	ATTAGGGTTGACAAGAGAAG	M	TCA	167
BMr148	BMb2245w	AMMD	PV_GBa0085N11.f	Primary hit	ACAAGATCGTAGAAGATTCC	CTCACTACTTTTAGAGAGAGA	M	GT	382
BMr149	BMb2246w	AMMD	PV_GBa0086D22.f	Primary hit	CTACATAGCCGTTTGAAGA	GTGGAGGTAGAGGATAAAAT	M	AT	375
BMr150	BMb2247w	AMMD	PV_GBa0088O15.f	Primary hit	TTGTAATAGAGTTGGACCAC	TAATAGGCTTCCGTCTTTAG	M	ATTT	391
BMr151	BMb2248w	AMMD	PV_GBa0089C04.r	Primary hit	GGTCTTGATCATCTCACC	GTATACTGTCTATAAGCCCTGA	M	TCA	373
BMr152	BMb2249w	AMMD	PV_GBa0089I17.r	Primary hit	GGCTATCTGTTTCTGATATG	CATAGCATACTTACCTTGT	P	ATTG	130
BMr153	BMb2250w	AMMD	PV_GBa0090C21.f	Primary hit	TTAGTGTTTTCTGACAGC	CATAACTATCACAGTGGTCATC	M	GAT	357
BMr154	BMb2251w	AMMD	PV_GBa0091E10.r	Primary hit	ATCAGTGTATCGGACTTAGA	TCCTAACAGAGTATTCATGG	M	GT	341
BMr155	BMb2252w	AMMD	PV_GBa0092F22.r	Primary hit	GATGACGAAATCTCACCT	CAGGAGATGAAGAAGAAGA	M	TAA	374
BMr156	BMb2253w	AMMD	PV_GBa0092F22.r	Primary hit	CCTGTTCCCACTAGTTAGTAT	CAGGAGATGAAGAAGAAGA	M	TC	300
BMr157	BMb2254w	AMMD	PV_GBa0092P14.r	Primary hit	ACTCAAGAACACAAGCTAAC	AGCCTTCTTCTCTAGTCTTATC	M	AGGA	184
BMr158	BMb2255w	AMMD	PV_GBa0094F13.r	Primary hit	GCATATTTTGTAGGGATGC	GTAATACACAAGACCCACCT	P	TATT	234
BMr159	BMb2256w	AMMD	PV_GBa0094I24.f	Primary hit	GTTGCACCTAAAATGGTC	CATCTCTGAAGCTAGACAA	M	TG	231
BMr160	BMb2257w	AMMD	PV_GBa0095N24.r	Primary hit	GTGAACAGTGATGAAGAAAG	GGAAGTGAAGAAATAGTG	M	CCCGC	348
BMr161	BMb2258w	AMMD	PV_GBa0096L10.r	Primary hit	AGTAAGTACTAAACCGAGTCAC	ACACGCCTATATAATAGCTC	M	TCT	235
BMr162	BMb2259w	AMMD	PV_GBa0097C14.f	Primary hit	ACTCTAGGCTCTAAACTTCAC	GAATCATGTAAGAGATGGTG	M	CA	155
BMr163	BMb2260w	AMMD	PV_GBa0097N15.r	Primary hit	CTTTGAAGGATGATGAAGG	AACTGGAGCAAACAGTTG	M	TTG	371
BMr164	BMb2261w	AMMD	PV_GBa0098K23.r	Primary hit	CTAAGTGTCAAACAACCTGGT	TTGACCTACTTATGCACTCT	M	AC	288
BMr165	BMb2262w	AMMD	PV_GBa0098O09.f	Primary hit	CAATGGCTACCAATGAAG	GATTGAGCTTGAATCACC	M	CAT	281
BMr166	BMb2263w	AMMD	PV_GBa0099I04.r	Primary hit	GCCTTCTTCTCTAGTCTTATCT	GAACCACAACTCAAGAAC	M	CTTC	215
BMr167	BMb2264w	AMMD	PV_GBa0099J13.f	Primary hit	CAGATCAAACACATCACAC	GGTTTCTTCTTCTCTTCT	P	GA	366
BMr168	BMb2265w	AMMD	PV_GBa0099K04.r	Primary hit	GATCACAGGTTTAAAGTGAC	TTCTTGATGAGCTATCTGAC	P	CAA	258
BMr169	BMb2266w	AMMD	PV_GBa0101P24.f	Primary hit	CTAGCAATTCTCACTAGTCAC	TCAAGAGATGAGTCCAAAG	M	AACA	289

BMr	Equivalency to BMb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr170	BMb2267w	AMMD	PV_GBa0102H10.r	Primary hit	CTAACAACTTTGACCACTTG	GTATACAAAGACCCAGTCTAT	M	AAAG	154
BMr171	BMb2268w	AMMD	PV_GBa0105B01.f	Primary hit	GTTTGTGGCTTATGGATTTT	TACAGATGGGAAGGAAAGTAG	M	TTGC	115
BMr172	BMb2269w	AMMD	PV_GBa0107D23.f	Primary hit	ATATGCTAACTCATCACTGG	AACTCACTTCTGGATAGTGTC	P	TAAC	350
BMr173	BMb2270w	AMMD	PV_GBa0116K06.r	Primary hit	CTACTTACTGAAATCTCTCCTC	AGGATTGTTTAGCCTGTC	P	AT	353
BMr174	BMb2271w	AMMD	PV_GBa0117N06.f	Primary hit	AGGGAGTAGAGTAGATGAATG	GTACGTAATGACTGACAAGTCT	P	ATGA	265
BMr175	BMb2272w	AMMD	PV_GBa0119A01.f	Primary hit	TAGGCACTAATCTTCACATC	AAGGTGTATGGAATCCTATC	M	CA	393
BMr176	BMb2273w	AMMD	PV_GBa0119E05.r	Primary hit	GGTTATGTACCTTCACTGTATC	AGTTAAGAAGGTTGGTGAAC	NA	TCAT	114
BMr177	BMb2274w	AMMD	PV_GBa0122H20.f	Primary hit	CCTCATTGATGGACAAACC	CAAAGATTGGATGGTTAGGG	M	Composed	222
BMr178	BMb2275w	AMMD	PV_GBa0123K07.f	Primary hit	GGAGGCTGAATTGTAACCT	CCGAAAGACACATATTGGAC	M	CTT	275
BMr179	BMb3000I	SSRlocator	PV_GBa0004G22.f	Primary hit	GAAAATTGTGATGTGGTTAT	AGTAGTGAAATGTGGAAAAA	M	TAATTA	272
BMr180	BMb3001I	SSRlocator	PV_GBa0009A15.f	Primary hit	CATCAGATATATAAGCCAG	CCTCACAAAATTTAGCATA	P	AAT	272
BMr181	BMb3002I	SSRlocator	PV_GBa0010B03.r	Primary hit	CTTGGGGACCCGTTT	TAGAATATGTTTTGTCGGT	NA	ATA	131
BMr182	BMb3003I	SSRlocator	PV_GBa0025I05.r	Primary hit	AAAACGAAATCTATTCCCT	TCAAATGTATTCTTGGTAGTG	P	Composed	252
BMr183	BMb3004I	SSRlocator	PV_GBa0031K21.r	Primary hit	CCTAAAACGAGAATCAGTAA	GACATCGTCAGTTAAATGTT	P	Composed	273
BMr184	BMb3005I	SSRlocator	PV_GBa0032M16.f	Primary hit	CACCAACAAAGATAGACATT	TTTAATTCATACAACCAAAA	NA	TTTA	293
BMr185	BMb3006I	SSRlocator	PV_GBa0036K17.r	Primary hit	TTTTCTTGTTAATCTTTGC	CTAAGCACCTTTCTAAACAA	M	AAGCCC	141
BMr186	BMb3007I	SSRlocator	PV_GBa0038I05.r	Primary hit	TTGATGTTATTTTGTAGGA	ATGTAAAGTGTGGTGAAAC	P	AT	203
BMr187	BMb3008I	SSRlocator	PV_GBa0044L20.f	Primary hit	TCAAACCATTGCTTACTTAG	CACTGGAAAATGTTAAGAAC	P	AT	289
BMr188	BMb3009I	SSRlocator	PV_GBa0056H11.f	Primary hit	TTGGGTTTCTTAGTCATTTA	ATAATGCACAATAGGAAGAA	P	AT	285
BMr189	BMb3010I	SSRlocator	PV_GBa0058O19.r	Primary hit	ATTCTTGTTGTGTGATTTC	GATTGTTAGGAGGTTAGGTT	M	TTG	286
BMr190	BMb3011I	SSRlocator	PV_GBa0071O11.r	Primary hit	GATTGATTTGAAGGAAATCT	ACATTAACCTTGGTTGGTAA	M	CGACCA	219
BMr191	BMb3012I	SSRlocator	PV_GBa0086E14.r	Primary hit	GGATATGAAACCATCAAATA	ACACAAAATACGAAGATTT	P	AT	257
BMr192	BMb3013I	SSRlocator	PV_GBa0093K15.f	Primary hit	GAACTGGTATACGTGTTTGT	CCTTAAGCATATCTTGACAC	P	TA	194
BMr193	BMb3014I	SSRlocator	PV_GBa0105L24.f	Primary hit	ATGCATAATTATCTTCCAAA	GGGAGATTAAATTGATTTTT	P	TATT	243
BMr194	BMb3015I	SSRlocator	PV_GBa0112M13.r	Primary hit	TGGTGAGTGTATATATGGGT	ATTCAGTGGTTTTGAAGATA	NA	Composed	108
BMr195	BMb3016I	SSRlocator	PV_GBa0113I08.r	Primary hit	CTCTCTCTTGCTGTAGAAA	TTATTCAGAATTTGTGGG	M	AT	175
BMr196	BMb3017I	SSRlocator	PV_GBa0113L13.f	Primary hit	GTTGATAGTCTTATTGCACA	ATAATATAAGCTCCCGTTCT	M	Composed	172
BMr197	BMb3018I	SSRlocator	PV_GBa0118H21.r	Primary hit	GCCAATTTGTACACTTAGA	TGACTTCTTTGTTTCATTT	P	TA	148
BMr198	BMb3019I	SSRlocator	PV_GBa0125E06.f	Primary hit	CTGGTTGATAGTCTTATTGC	ATAATATAAGCTCCCGTTCT	P	Composed	175
BMr199	NA	Batchprimer3	PV_GBa0094O06.r	Secondary hit	AAAGAGGACGACACCTCAC	CACACGTTATCTTTGCTTGA	P	GAA	329
BMr200	NA	Batchprimer3	PV_GBa0108O14.r	Secondary hit	AAATGTTTCTTAACTCGCCA	ATTGATTTACAAGTCCGGTT	M	TAA	330
BMr201	NA	Batchprimer3	PV_GBa0120I10.r	Secondary hit	AACACGCCAATCTCTCTTA	CGAGTTGGACTCAGAAGAAC	M	GAA	307
BMr202	NA	Batchprimer3	PV_GBa0026N08.f	Secondary hit	AACATGCTGCAGTGATAAGAA	GATACCATGACAAAGGGAGA	M	TAA	314
BMr203	NA	Batchprimer3	PV_GBa0057L12.f	Secondary hit	AACCAACACAACAACATCAA	GTTGCAAAGAGGGTGAGTAG	M	GA	398
BMr204	NA	Batchprimer3	PV_GBa0074F10.f	Secondary hit	AACCAAGATGCCATAGAAGA	TCCTTAAATTTCTGAATTTGC	P	TA	328
BMr205	NA	Batchprimer3	PV_GBa0031O12.f	Secondary hit	AACCATGGAGAGTGATTCTG	TCAAGTGAGAGGGAGAGAGA	P	GAT	293
BMr206	NA	Batchprimer3	PV_GBa0099M10.f	Secondary hit	AACCATTACATCAGTCAAGTTT	CGGATATTATTACCCACCAA	P	ATT	310
BMr207	NA	Batchprimer3	PV_GBa0084K20.r	Secondary hit	AACCTCTGGAGTAATAGAAGAA	GCTCACACATGCTAAAGACA	P	AAATA	249
BMr208	NA	Batchprimer3	PV_GBa0108F05.f	Secondary hit	AACCTCACAAATTCAGGCAT	CCATGAGGAAGGAATGATAA	P	AT	227
BMr209	NA	Batchprimer3	PV_GBa0095B14.r	Secondary hit	AAGAAGAAGAAAGGAGTAGATCA	CCTCAGCAGGTAATTCAAAC	M	TA	272
BMr210	NA	Batchprimer3	PV_GBa0087P04.f	Secondary hit	AAGAGCATGTTTACTTCACTCA	AAATGTTTCATCCAGAATTAGTTA	M	TTTAT	326
BMr211	NA	Batchprimer3	PV_GBa0007H01.r	Secondary hit	AAGGACGACACCTCACATAC	TCCGACACCTATTACCAATC	M	AGA	319
BMr212	NA	Batchprimer3	PV_GBa0093G05.r	Secondary hit	AAGTTATGAATGCTTGCCTC	GTCCGATGTCTGATGTCTTT	M	TGG	234

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr213	NA	Batchprimer3	PV_GBa0002O02.r	Secondary hit	AAGTTGTTTCGCACAATTAGG	CCAAGCATGAATACAGAACC	M	TTTTA	163
BMr214	NA	Batchprimer3	PV_GBa0060E02.f	Secondary hit	AATCTTGACTGGACCAAGG	TGCTTTTATAATTAACAAACCT	M	AT	383
BMr215	NA	Batchprimer3	PV_GBa0038O23.f	Secondary hit	AATTATTTCCAATACTGTTGAAT	AATACGACGAAAGTTAAGCG	M	AAAT	369
BMr216	NA	Batchprimer3	PV_GBa0057N17.f	Secondary hit	AATTCAACTGTTCTTGTGG	TTAGCCTTGTCTTCTGAGC	M	TTTAT	365
BMr217	NA	Batchprimer3	PV_GBa0015M24.r	Secondary hit	AATTGGGAAAGAAATAGGGT	GGCTGCTTACAAACCATTAC	NA	TC	159
BMr218	NA	Batchprimer3	PV_GBa0064A11.r	Secondary hit	ACCAATCAATATTCGCAAGT	TTGCTCTTAAGTGTCCATT	M	ATA	298
BMr219	NA	Batchprimer3	PV_GBa0043C22.f	Secondary hit	ACCTGTTGATTTGTCGTTTC	TCCTATCCCACTCTTAACCA	M	AG	386
BMr220	NA	Batchprimer3	PV_GBa0108I20.r	Secondary hit	ACGCCCCAATAGTCATACATTA	TTCTCGAAGAAACGTTCAAT	P	AT	365
BMr221	NA	Batchprimer3	PV_GBa0098H03.r	Secondary hit	ACGCCCCAATAGTCATACATTA	TTTCTCGAAGAAACGTTCA	P	AT	366
BMr222	NA	Batchprimer3	PV_GBa0022D22.r	Secondary hit	ACTAATTCAACCTGGTCGC	CTGAATTACATCAATCATTCAAA	M	TTAT	279
BMr223	NA	Batchprimer3	PV_GBa0001N23.f	Secondary hit	ACTATTTATGCAATAGTGATGAT	GAAATTCACACCTTCCTTGA	NA	ATA	152
BMr224	NA	Batchprimer3	PV_GBa0117E03.f	Secondary hit	ACTCTGTTGAACAGATTGG	ATCATCAATTACTCGCACCT	M	ATTAA	293
BMr225	NA	Batchprimer3	PV_GBa0043J12.f	Secondary hit	ACTGGACTGATGCAATTCTT	TGTCAAGATTCATGCACACT	NA	AT	249
BMr226	NA	Batchprimer3	PV_GBa0085F04.f	Secondary hit	ACTTCTTCGGTACGAGTGA	TTTAACACAACCAATTTATTGAA	M	TAT	352
BMr227	NA	Batchprimer3	PV_GBa0085K08.f	Secondary hit	AGATGTGGGTACTTGAGTGG	AACCTGAGTTTGAATGATG	P	ACAAT	255
BMr228	NA	Batchprimer3	PV_GBa0108O02.f	Secondary hit	AGCAAAGCACTCTTCATCAT	TAGCAACGAGAACAATTTGA	M	AAAT	251
BMr229	NA	Batchprimer3	PV_GBa0058E18.f	Secondary hit	AGCCAAGTTGGAGATATTCTT	GTTAGCTCTCAGCCACAATC	M	ATA	398
BMr230	NA	Batchprimer3	PV_GBa0043L05.r	Secondary hit	AGCCACATTTAGTCTCCTTC	TCGTTCTGCTCAAGGTTAGT	P	GAA	274
BMr231	NA	Batchprimer3	PV_GBa0047I15.r	Secondary hit	AGCTTAAGAGGAACCGAAGT	TGGAGTAACAGTGGTTGTGA	P	GAT	304
BMr232	NA	Batchprimer3	PV_GBa0056G03.r	Secondary hit	AGGATGTGCAATGAAATGAA	GGGATTCCAATGACTTGATA	M	AATA	178
BMr233	NA	Batchprimer3	PV_GBa0025O04.r	Secondary hit	AGGATTACCATACCTCATGC	ATTATTTCTGTTGATCGGTGT	NA	AT	387
BMr234	NA	Batchprimer3	PV_GBa0092L19.f	Secondary hit	AGGTACTCACGGTGGTGTAG	GTCGATCACTGTTTCGAAGT	P	TAATA	256
BMr235	NA	Batchprimer3	PV_GBa0001N19.f	Secondary hit	AGTAGAAAGCCACGAATTGA	AGCAAACAGATCACACATGA	M	AAAAT	299
BMr236	NA	Batchprimer3	PV_GBa0019H11.f	Secondary hit	AGTTGCGTTGCTTGAATAG	CCACCCTCTTCTCTTAATTC	M	TCTT	143
BMr237	NA	Batchprimer3	PV_GBa0108O02.f	Secondary hit	ATCAAATTGTTCTCGTTGCT	ACAAACAAACCAATTCTCAA	M	TTA	289
BMr238	NA	Batchprimer3	PV_GBa0043J12.f	Secondary hit	ATGATTTGAAGTGTGCATGA	CATTGTGGACAAACAATGAG	P	TA	384
BMr239	NA	Batchprimer3	PV_GBa0115N13.r	Secondary hit	ATGGTGCCCTTCATACAATA	CCAGATACGTGAGTGATGTG	NA	ATT	394
BMr240	NA	Batchprimer3	PV_GBa0021M18.f	Secondary hit	CAAACCTACATGCCAAATAA	AGTTGTAAAGGTCTCTCTTCT	M	AATTA	334
BMr241	NA	Batchprimer3	PV_GBa0019H11.f	Secondary hit	CAAGAAAGCAAGCATGAAAT	TTCCCTCTTCTCTCCTTCT	P	AAGA	172
BMr242	NA	Batchprimer3	PV_GBa0046D21.f	Secondary hit	CACAAACACAGACACCAAAG	TTTGGTCCCTGATTGAAA	M	TC	364
BMr243	NA	Batchprimer3	PV_GBa0092P16.r	Secondary hit	CACATTGTGGAGTGAAAGAA	TTTCTGGGATTTAGTTGACA	P	AT	328
BMr244	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016C18.r	Secondary hit	CACGTAATCACCAGTTAGCA	TGAGATATTGTTGGTCATACCT	P	AT	289
BMr245	NA	Batchprimer3	PV_GBa0017K23.f	Secondary hit	CAGTTGTGTCATTGCTAACG	CCATGGAAGTGAGAAGTGAT	P	AT	400
BMr246	NA	Batchprimer3	PV_GBa0074K01.f	Secondary hit	CATGGGAAGAGTGAAGGTAA	TCCAGACAGCAATGTTTATA	M	CATGG	311
BMr247	NA	Batchprimer3	PV_GBa0051J05.f	Secondary hit	CATTCTTCTTCTTCTTCTT	AAATTGATTTATTACCGCAA	P	TAA	394
BMr248	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016A07.f	Secondary hit	CCAATCAGAATTGGAGTTTC	GAGTGAAGAAAGGTGCAAAAG	P	TCC	362
BMr249	NA	Batchprimer3	PV_GBa0013D01.r	Secondary hit	CCACCAGAGATAGACAGAGC	CAGCACCGTTACACAAATTA	P	TC	280
BMr250	NA	Batchprimer3	PV_GBa0046K10.r	Secondary hit	CCACTACACCAGACAAGTTCT	CCTGTGTTCCCGCTAGTAT	P	TTA	243
BMr251	NA	Batchprimer3	PV_GBa0113I19.f	Secondary hit	CCATAACACATGTACGAATTG	TATAATGGAGCCCTTCACAG	M	TTA	363
BMr252	NA	Batchprimer3	PV_GBa0059H23.r	Secondary hit	CCATCTTGAAATAAACAGGC	GTCGTCAATTGGATGAGATT	M	ATTTT	359
BMr253	NA	Batchprimer3	PV_GBa0009M06.r	Secondary hit	CCGCTAAGCCTTCATTATTA	ATATATTATGTTTGCCTGGG	NA	AAT	175
BMr254	NA	Batchprimer3	PV_GBa0001L21.f	Secondary hit	CCTCTTGTCTTGTATTGAA	CTTGACAAACCTCGCTTAA	NA	AT	388
BMr255	NA	Batchprimer3	PV_GBa0125G15.f	Secondary hit	CCTCTTTCACATGGATCACT	CAAAGTATTGTATTGCGATCAT	P	AATTT	328

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr256	NA	Batchprimer3	PV_GBa0078E24.f	Secondary hit	CCTTCCTTAAATAACTTCCG	ATGGCTAGCCTAATAGGGAT	NA	AATAA	351
BMr257	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016N04.r	Secondary hit	CGGATTAAGGACCTTTCTTT	CACACTTTACACTCTCCCT	M	TTTTC	363
BMr258	NA	Batchprimer3	PV_GBa0071N19.r	Secondary hit	CGGTGGTTATGGTATGATCT	TGAACCTGGAATGGAGAACT	P	TA	304
BMr259	NA	Batchprimer3	PV_GBa0012E18.f	Secondary hit	CGTTAGAATCATTGAAGGC	CACCAATGTTCTTCCAATTT	P	AT	363
BMr260	NA	Batchprimer3	PV_GBa0059C04.r	Secondary hit	CGTTGTTGTTTCATGCAGATA	ACTGTTCCCTTCTCTCTCC	M	GA	244
BMr261	NA	Batchprimer3	PV_GBa0052B18.f	Secondary hit	CTAAACCCAGGTGCATGTAT	TTGACAAATCGCATGTTCTA	M	AATAA	381
BMr262	NA	Batchprimer3	PV_GBa0029P09.f	Secondary hit	CTCTAGCTCGTGAGGACAAG	TGTATACAAATGTGTGATGGATT	P	TTAA	341
BMr263	NA	Batchprimer3	PV_GBa0078O18.f	Secondary hit	CTGACCTCGATCTTTCTGAG	GAACCATCCAGTTAAACCAA	NA	AT	253
BMr264	NA	Batchprimer3	PV_GBa0049B19.f	Secondary hit	CTGCATAACATTTGGGAGAT	GTGGAACAAATCCATAGGAA	P	CTT	375
BMr265	NA	Batchprimer3	PV_GBa0046E12.f	Secondary hit	CTTTCGTGACAAGGAGAAAC	AGGTTAACACGATTTGTATTG	P	AT	177
BMr266	NA	Batchprimer3	PV_GBa0120I10.r	Secondary hit	CTTCTCACGAGTCATGGAT	CTTCCGAAACAACTCAAAC	P	TTTA	393
BMr267	NA	Batchprimer3	PV_GBa0019H11.f	Secondary hit	GAATTAAGGAAAGAGGGTGG	TTCTTTCTTTCTTTCTTGATTG	NA	AAGC	400
BMr268	NA	Batchprimer3	PV_GBa0059C08.r	Secondary hit	GACAGAGTGGTGGGAAATAA	AATTGTACAGTTTCGATGGG	P	TA	304
BMr269	NA	Batchprimer3	PV_GBa0113J08.r	Secondary hit	GACCCACGTACTGTGAATTT	CACACGAGCAGTTATTCTCA	P	AT	353
BMr270	NA	Batchprimer3	PV_GBa0062F19.f	Secondary hit	GAGAAAGAAAGCAAGCAAGA	GGAAGGAAAGAGAGAGAGAAA	P	TCTT	281
BMr271	NA	Batchprimer3	PV_GBa0046J17.f	Secondary hit	GAGAAGAGGTCAGATGCAAG	GCTCTAGTAAGGAATGAACCAG	NA	GA	381
BMr272	NA	Batchprimer3	PV_GBa0008E19.r	Secondary hit	GAGAAGAGGTCAGATGCAAG	TTCTAGTAAGGGAATGAACCA	NA	GA	380
BMr273	NA	Batchprimer3	PV_GBa0029C08.r	Secondary hit	GAGCACCATTATAGCAAGC	AGCATAGCAAGAACATGGAC	P	AT	373
BMr274	NA	Batchprimer3	PV_GBa0052O22.f	Secondary hit	GAGTTGTGAGTGTGCAATG	TCATCTTGTGTGTCTTGG	P	TA	386
BMr275	NA	Batchprimer3	PV_GBa0054H22.r	Secondary hit	GATGCAAAATCATCTCTGACA	GTTATGAATTTGACCATCG	M	AT	382
BMr276	NA	Batchprimer3	PV_GBa0056D03.f	Secondary hit	GCACACTGCTTTGTCTTA	GAGACCATCCCATCTGATAA	M	TTAA	370
BMr277	NA	Batchprimer3	PV_GBa0115N03.f	Secondary hit	GCACCGAAAGATCTAGCTTA	TGATCAGACAGAAATCAAGCA	M	AT	378
BMr278	NA	Batchprimer3	PV_GBa0013B10.f	Secondary hit	GCCCGTTTCTTTCTTCTACT	TTGTACCACCATATCACAACCT	M	AT	378
BMr279	NA	Batchprimer3	PV_GBa0004C17.f	Secondary hit	GCGAGAACAACATCAATAA	GCTCAACACGCCTACATAAT	M	AAAC	394
BMr280	NA	Batchprimer3	PV_GBa0029L10.r	Secondary hit	GCTTGAACAACCAACCTAAC	AGGGTTAATAAGAATACTGGCA	M	AT	334
BMr281	NA	Batchprimer3	PV_GBa0027F22.f	Secondary hit	GGAAAGACATACCCTATCCC	CATTGTCATCACCACCACTA	P	GGT	312
BMr282	NA	Batchprimer3	PV_GBa0003J22.f	Secondary hit	GGAAATGATTCTTACCACCA	AATTACATAGGATTGTATCCGT	NA	TAT	289
BMr283	NA	Batchprimer3	PV_GBa0114C06.r	Secondary hit	GGAGATCAATTTAGCAACCA	TCACAATATGATGACGAGGA	M	TAT	234
BMr284	NA	Batchprimer3	PV_GBa0114C06.r	Secondary hit	GGAGATCAATTTAGCAACCA	TCACACTACAAATCAACGCT	NA	ATT	392
BMr285	NA	Batchprimer3	PV_GBa0005C04.r	Secondary hit	GGATATCATCGGAGAGTGAA	TTTGAATTGGATGTTTCTATCA	M	TTA	383
BMr286	NA	Batchprimer3	PV_GBa0112K18.f	Secondary hit	GGATCAAGGAGAATTGTTGA	GCTAAATCGTGCCATATTTT	P	AT	361
BMr287	NA	Batchprimer3	PV_GBa0001L18.f	Secondary hit	GGCAATTTGTAACATCCCTA	TTTATGGCTAGCTTACCCTG	P	AT	300
BMr288	NA	Batchprimer3	PV_GBa0051O21.r	Secondary hit	GGCACCCTAATCAATTCTC	GACCACCACGAATATCTTA	M	CACAA	297
BMr289	NA	Batchprimer3	PV_GBa0113I19.f	Secondary hit	GGGTGATCTTGAGTTGTGTT	CAATTCGTACATGTGTTATGG	M	TAAAT	298
BMr290	NA	Batchprimer3	PV_GBa0074E03.r	Secondary hit	GGGTTTGTGTTGAGTGAAT	CCAACCTTAATACTGGCGAC	NA	AT	328
BMr291	NA	Batchprimer3	PV_GBa0122G16.f	Secondary hit	GTCTGTGAATAGCCATTGGT	GGAAGGTTAGAGGAGAGAAGA	P	CTCTC	339
BMr292	NA	Batchprimer3	PV_GBa0037K24.f	Secondary hit	GTGCATGAAGACGAGTAAGA	TGATTCATCTCCCAACAAAT	P	AT	320
BMr293	NA	Batchprimer3	PV_GBa0030A23.f	Secondary hit	GTTAGGCAAGCTATTCTGTG	GTGCTACATAGGTAATGGGC	M	TA	287
BMr294	NA	Batchprimer3	PV_GBa0083A11.r	Secondary hit	GTTCTTGAGGTGAATCAAGG	CAACCACCAGACAAGACAAT	M	TAA	209
BMr295	NA	Batchprimer3	PV_GBa0032H18.r	Secondary hit	TAAATCTCTTGGGTGCTGAT	ATTATGTTGGGTGCAGATTC	P	AAAC	393
BMr296	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016L09.f	Secondary hit	TAGTTAGCAGAAGCATGCAA	AAGTGCTCCTTGTATCCAA	M	ACAAG	152
BMr297	NA	Batchprimer3	PV_GBa0036E17.f	Secondary hit	TATCCATTTCCAATTTCTG	CAAAGCAGAGTCATTCTTC	M	ACTC	373
BMr298	NA	Batchprimer3	PV_GBa0046J13.f	Secondary hit	TATCGTGGGTGGACAACAT	AGGGAGTACGTACAAAGCAA	P	TA	308

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr299	NA	Batchprimer3	PV_GBa0027P05.f	Secondary hit	TATTTATGAGCGTCAGGTCA	CATGTTAACCTCTGCTTCAA	P	AC	367
BMr300	NA	Batchprimer3	PV_GBa0050G10.f	Secondary hit	TCAAAACAATTGATTATCCAAA	GGCATGAAGTTCAATCATGT	P	TA	212
BMr301	NA	Batchprimer3	PV_GBa0108E23.r	Secondary hit	TCACATTTGAAGTTCCAAGA	GTTGTTCTAGGTGTCAGGGA	M	CTTTT	326
BMr302	NA	Batchprimer3	PV_GBa0078I24.r	Secondary hit	TCATATCTTGCATGTTTCCA	TTAACTTATTTAACCTTCACCA	P	AAAT	310
BMr303	NA	Batchprimer3	PV_GBa0015D15.r	Secondary hit	TCCCTATACACACGATCCTC	CTTCTTCGTTTCGTCTAAAG	M	GAA	391
BMr304	NA	Batchprimer3	PV_GBa0069M23.r	Secondary hit	TCCTCCATCACCTACCTATG	AGGAGGTGGAGATTGGTAAT	NA	TTA	334
BMr305	NA	Batchprimer3	PV_GBa0063O14.r	Secondary hit	TCCTGTAGGAGTTGTTGGTC	TGTTGTGCTTGAAGAAAGTG	P	GAA	365
BMr306	NA	Batchprimer3	PV_GBa0090A11.r	Secondary hit	TCTAGCACTTGAGCCTCTTC	ATGTTGAGTCGTGTCTACCC	M	CGACT	312
BMr307	NA	Batchprimer3	PV_GBa0062F19.f	Secondary hit	TCTATCGTCGTGAAAGTTGA	TCTTGCTTGCCTTCTTCTC	P	AAAC	313
BMr308	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016L09.f	Secondary hit	TCTCGAAGCTCTCTCAGTTT	TCTGGTTATTGAAGCCAAC	P	AAAAC	232
BMr309	NA	Batchprimer3	PV_GBa0115C01.f	Secondary hit	TGAACAGATAACGATCCTCC	GGATGAAGCTGATCAAAGAG	P	TA	349
BMr310	NA	Batchprimer3	PV_GBa0118E03.r	Secondary hit	TGAAGGAGAAAGGAAGACAA	GGGAAGTAATTGCCCTATTA	M	TTAAA	225
BMr311	NA	Batchprimer3	PV_GBa0092E16.f	Secondary hit	TGATAAAGTAATACGTGGATGG	GATCCAGACCAACCATAGAA	M	AT	366
BMr312	NA	Batchprimer3	PV_GBa0022I11.r	Secondary hit	TGATCGAACAAGCACATAG	AAGCAAGAAATATGGGTGA	P	ATTG	318
BMr313	NA	Batchprimer3	PV_GBa0044C06.f	Secondary hit	TGATGGTTATGCAAGTGTGT	GCGAGAGGATCATATGGTAA	M	AT	345
BMr314	NA	Batchprimer3	PV_GBa0023L20.f	Secondary hit	TGCAATGATGAAGAAGAACA	AGAACAATGCTGGGACTTTA	M	AGA	391
BMr315	NA	Batchprimer3	PV_GBa0013E04.f	Secondary hit	TGCTACAATTGCTACCACTG	CCTACATCTTCTCCTCCTT	M	CTA	281
BMr316	NA	Batchprimer3	PV_GBa0018B16.r	Secondary hit	TGGATAAGATATGTCGGGAT	TGAACGTGGAAGTTCAATA	NA	TAAT	400
BMr317	NA	Batchprimer3	PV_GBa0078I24.r	Secondary hit	TGGTTAAGTTTGATGCATGT	TACAGTAACAACCTCCTGCC	P	TTTA	314
BMr318	NA	Batchprimer3	PV_GBa0085F04.f	Secondary hit	TTCAATAAATTGTTGTGTTAAA	AAATGTGGAAGTGAAATTCCG	P	AT	359
BMr319	NA	Batchprimer3	PV_GBa0055M14.f	Secondary hit	TTTCGTTAAATAGTGCATAAATCA	TGAAATTCCGTCAGTACATTT	NA	TTAT	293
BMr320	NA	Batchprimer3	PV_GBa0056D03.f	Secondary hit	TCTCTTCATTGCTCTAACA	TTTGGATCAACATCTAGGGTC	M	TC	261
BMr321	NA	Batchprimer3	PV_GBa0101K19.f	Secondary hit	TTGAGGGAGAAGATGGAAT	GATAAATGTGTGAATGCCCT	M	TA	253
BMr322	NA	Batchprimer3	PV_GBa0069J21.r	Secondary hit	TTGATTCGTTTAACTCCCTT	ACTTAGGTGTGGTGGTTTCA	M	TA	359
BMr323	NA	Batchprimer3	PV_GBa0058C21.r	Secondary hit	TTGATTTCTACAAATTGGTTTCT	TTTATATGCACCACCGAAA	P	TATT	269
BMr324	NA	Batchprimer3	PV_GBa0016L09.f	Secondary hit	TTGGATAACAAGGAGCACTT	TTCTACCATCAAGGATGACC	M	TGTCA	385
BMr325	NA	Batchprimer3	PV_GBa0033N04.f	Secondary hit	TTGGGTAACCCTACAAGAAA	ACCAACGAATCTATATCCAAA	M	TTA	350
BMr326	NA	Batchprimer3	PV_GBa0035F06.f	Secondary hit	TTGGTCGCTAAATGTAATTG	AAATTTAATTATGTGGCGTAA	M	TAA	345
BMr327	NA	Batchprimer3	PV_GBa0115N03.f	Secondary hit	TTGTGGATGAATATGAAGCA	TAAGCTAGATCTTTCGGTGC	NA	GAAA	213
BMr328	NA	Batchprimer3	PV_GBa0027L11.r	Secondary hit	TTGTGTGAAAGCCATAATCA	GAAGTGTGTTTCTGGTGGTT	P	ATAAG	383
BMr329	NA	Batchprimer3	PV_GBa0079A06.f	Secondary hit	TTGTTCAATCACGAAGGTAA	ACGGATACAGATTCGTAGGT	P	(TAA)4	400
BMr330	NA	Batchprimer3	PV_GBa0088P06.r	Secondary hit	TTTAGGCTCAAGAGAGTTTG	TCATATTGGAGTCTTCCACC	M	(ATG)9	383
BMr331	NA	Batchprimer3	PV_GBa0046L17.f	Secondary hit	TTTATCTCCGGAGTCAACT	CATGAAGAACATCATCCCT	P	TA	309
BMr332	NA	Batchprimer3	PV_GBa0010F19.r	Secondary hit	TTTCACTTTACAAGCTGGGT	TAGATCGAAGGATGATTTGG	NA	(AAT)5	400
BMr333	NA	Batchprimer3	PV_GBa0072L09.f	Secondary hit	TTTCATTTAAGTAAGGCATTAAA	ATTATTGATGTTTCATACATTGT	P	TA	363
BMr334	NA	Batchprimer3	PV_GBa0050G10.f	Secondary hit	TTTGACCCACACTCAGTAAA	CACTGTCACTGTTGAACGAT	M	(GTTT)4	178
BMr335	NA	Batchprimer3	PV_GBa0051J05.f	Secondary hit	TTTGCGGTAATAAATACAA	AGGATGTACTGCCTCTTTCA	M	(AAAT)3	207
BMr336	NA	Batchprimer3	PV_GBa0052M16.r	Secondary hit	TTTGATTTGAAGTTGCTTT	CAACCTTGGTCATTCAAAC	M	TA	344
BMr337	Bmb4	Batchprimer3	PV_GBa0083J17.f	Secondary hit	TTGAGCATGCTTGTCTAGTG	TTGCATGATATTGATGATCC	P	TA	153
BMr338	Bmb10	Batchprimer3	PV_GBa0012B21.r	Secondary hit	GAGGCAATTCGTTTGAAATA	AGACAATCCGTTATACAATCT	P	AT	225
BMr339	Bmb111	Batchprimer3	PV_GBa0044I12.r	Secondary hit	GTTCTGTCAGCAGTGTAGCA	AGCTCGTACAACACCAAAGT	M	AAT	244
BMr340	Bmb12	Batchprimer3	PV_GBa0027C15.f	Secondary hit	GCATTATCAATCCCTCACAT	AAGCGTGAGAGTGTCTTTGT	M	AT	239
BMr341	Bmb122	Batchprimer3	PV_GBa0002I17.r	Secondary hit	AAATCTTTACTCTTCATGCATTT	ACTTGCACGGGATAGATTC	P	AT	268

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr342	BMb130	Batchprimer3	PV_GBa0118L12.r	Secondary hit	TTAAATGAGCGGTTATTGGT	CGAATTTGAATCCGTAGGTA	P	ATA	270
BMr343	BMb157	Batchprimer3	PV_GBa0109O17.f	Secondary hit	TGACTCAAACCAACTTATGC	CATCTTAGTCTCTGCTGCTTC	M	AT	221
BMr344	BMb2	Batchprimer3	PV_GBa0032N21.f	Secondary hit	AATGTCTTTCCGACACATTC	GACCAATTGATTTAGTTCGG	M	AT	270
BMr345	BMb214	Batchprimer3	PV_GBa0050L20.r	Secondary hit	TGATTAACACATCACACGA	GAAGTATCATGGAGGAACCA	M	AT	125
BMr346	BMb252	Batchprimer3	PV_GBa0017K05.f	Secondary hit	TTTCATGTGACGAGTCATT	CTTCCACAATCCAGATGTTT	P	AT	282
BMr347	BMb267	Batchprimer3	PV_GBa0016G01.f	Secondary hit	TGAGCATCCTCTACTTGGTT	AATCTCGCCTCTCTCTCTT	P	GAA	224
BMr348	BMb275	Batchprimer3	PV_GBa0016A15.f	Secondary hit	AGGACACATCAACACATCCT	GGATTCAATTCGTCTGTTGT	P	AT	290
BMr349	BMb276	Batchprimer3	PV_GBa0060H14.r	Secondary hit	CCCAATTGAACTTGCTTAT	AACATGGAAGTCTCTCAACC	P	TA	210
BMr350	BMb294	Batchprimer3	PV_GBa0085J16.r	Secondary hit	GAATTGTTTAGACGAATGGC	TCGACCATGCATAATGTAAA	P	TA	213
BMr351	BMb296	Batchprimer3	PV_GBa0078P23.r	Secondary hit	AGCGTGGTATGATCAGATTC	AAGAGGAGATACGAGCATCA	M	GA	249
BMr352	BMb3	Batchprimer3	PV_GBa0013J16.r	Secondary hit	AAGCTTAACAACAAATTCGC	AAACCAAATCTCTCTCTCT	P	TA	130
BMr353	BMb352	Batchprimer3	PV_GBa0059C04.r	Secondary hit	CGTTGTTGTTTCATGCAGATA	ACTGTTCCCTTCTCTTCTCC	M	GA	244
BMr354	BMb353	Batchprimer3	PV_GBa0062L15.f	Secondary hit	AAATGCTGTAGAGCCACAT	TGGATTACACAAGGGTCTTC	M	TA	278
BMr355	BMb354	Batchprimer3	PV_GBa0092D07.f	Secondary hit	TGTCGAACCCAACTCTAAAT	TGTACCAAACCTCACCTACC	P	TTTTA	215
BMr356	BMb358	Batchprimer3	PV_GBa0088N20.f	Secondary hit	TGATTGACACATGTTTGGTC	GAGTCTCAAGTTCATTCAACG	NA	AT	197
BMr357	BMb36	Batchprimer3	PV_GBa0021M03.f	Secondary hit	GGTTTGGCTGACTGAATAAT	ATCAATCACCATCCCATTAG	P	AT	151
BMr358	BMb362	Batchprimer3	PV_GBa0006J20.r	Secondary hit	TATTCTGTGCGGGCATTCTTA	CCTCGCTAGAACAATCAAAG	P	TA	294
BMr359	BMb37	Batchprimer3	PV_GBa0042E03.r	Secondary hit	TGTATCCATCCACATGCTTA	ATTGTGGAAGAAGCTTGAA	P	AT	185
BMr360	BMb373	Batchprimer3	PV_GBa0027N15.r	Secondary hit	GAATATGAACCAGCACCTGT	CACCTGTTGCTGTTGATGAC	P	CA	183
BMr361	BMb420	Batchprimer3	PV_GBa0051I15.r	Secondary hit	CAGTTTATACCTGAGCAGCA	AAGGACGAAGACACAAGAAA	P	TA	296
BMr362	BMb454	Batchprimer3	PV_GBa0049D11.f	Secondary hit	GTAGTCTTTGGCTGTTGGAG	GCTGCATCATCCTCTTAAAT	P	ATA	227
BMr363	BMb483	Batchprimer3	PV_GBa0049A09.r	Secondary hit	ACATCCACCACAATTGATTT	CACACCTTCAGACAACGACAC	P	TA	158
BMr364	BMb493	Batchprimer3	PV_GBa0021L23.f	Secondary hit	TCCATAGACACCTACCCTTG	AACAAGCTCTGCTGACAAAT	P	AGA	174
BMr365	BMb499	Batchprimer3	PV_GBa0023L20.f	Secondary hit	TAAAGTCCCAGCATTGTTCT	CAGAATCAGTCTTCACCCAT	M	GGA	147
BMr366	BMb511	Batchprimer3	PV_GBa0026N08.f	Secondary hit	TCTCCCTTTGTCATGGTATC	TATGATAGGCAGTCGAGGTT	M	AAT	234
BMr367	BMb052	Batchprimer3	PV_GBa0028D02.r	Secondary hit	GTTGTTTGAATTGGGATTTG	TAGAAGATCCCAAGCCTGTA	P	AT	106
BMr368	BMb527	Batchprimer3	PV_GBa0089H04.r	Secondary hit	CCTATCCCCTTTGACCATACA	GAAATCATGGAGACAGCAAT	P	AT	218
BMr369	BMb053	Batchprimer3	PV_GBa0125H18.f	Secondary hit	CTGTGATTATGGTGATGGTG	ACCACACGCTCATAAAGAAT	P	TA	218
BMr370	BMb553	Batchprimer3	PV_GBa0016C18.r	Secondary hit	CACGTAATCACCAGTTAGCA	TGAGATATTGTTGGTCATACCT	P	AT	289
BMr371	BMb64	Batchprimer3	PV_GBa0010H04.r	Secondary hit	TGAATTGCATGATAGCTCTG	TATAATGGAACCCATAACGG	M	TA	250
BMr372	BMb67	Batchprimer3	PV_GBa0039F02.r	Secondary hit	CCGTAACACTTGGTTAGGAG	GAGATACAGTGGCCTAGCAC	M	TC	227
BMr373	BMb7	Batchprimer3	PV_GBa0046G14.f	Secondary hit	TTACTTGGTACCAGCAACCT	CTGTGTTTGGTTCTGTTGTG	M	CT	135
BMr374	BMb73	Batchprimer3	PV_GBa0112F17.f	Secondary hit	AACATGGCTCAAGATAATGG	GTTTACTTGGTGATGGAGGA	M	CTT	235
BMr375	BMb75	Batchprimer3	PV_GBa0105P06.r	Secondary hit	AAAGTCTCTTCTGCGTCAC	TGACCATTATTCATTCCCAT	P	AT	280
BMr376	BMb86	Batchprimer3	PV_GBa0100I24.f	Secondary hit	AGTAGAGTGGAATGACGGTG	AAGTTGAGCGCAGTAGAAAG	M	CT	175
BMr377	BMb87	Batchprimer3	PV_GBa0076A06.f	Secondary hit	CTGAAGTGGTGAAGGAAGAG	GATGGAGAGGAAGGAATGAT	NA	CTT	251
BMr378	BMb96	Batchprimer3	PV_GBa0009F12.f	Secondary hit	CATAAAGCACGTCACTTCAA	GCCTTGGACACTACCATTT	NA	CA	126
BMr379	BMb862s	Batchprimer3	PV_GBa0115B06.f	Primary hit	AACCTCTTTGCTCGTCATAA	TGAGGCAAGTGTTGCTATG	P	AT	264
BMr380	BMb3020L	SSRlocator	PV_GBa0001L21.f	Secondary hit	ACTTGTCTTTTCTTCTTCT	TCACAAAAGGAGAATGTTAT	M	AT	110
BMr381	BMb3036L	SSRlocator	PV_GBa0017B09.f	Secondary hit	GTGACAATATCAAAGAGAGG	ATTTTGCTAAAATTTGCTC	P	AT	130
BMr382	BMb3039L	SSRlocator	PV_GBa0018B16.r	Secondary hit	TAATGAGAGAAAAATTGGAA	AACTAATTATGAACGTGGAA	P	AT	241
BMr383	BMb3053L	SSRlocator	PV_GBa0025O04.r	Secondary hit	TTTTGAATTTTAAGCTAGGA	AACATAGCATTGACTGATTC	P	AT	172
BMr384	BMb3055L	SSRlocator	PV_GBa0025P08.r	Secondary hit	ATAAAGTGTGGGTAACGTGTG	ACTTAACCTTCATAATTATATTACA	M	AT	211

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr385	BMb3062L	SSRlocator	PV_GBa0029C08.r	Secondary hit	ATGATTATTGAGATGGAATG	GCTAATGGTTATAATGCCTA	M	AT	300
BMr386	BMb3089L	SSRlocator	PV_GBa0042L20.r	Secondary hit	AAAAATTATTAATAAGCGTGC	TTGTTTATTAACCTTAACTGTG	P	AT	219
BMr387	BMb3097L	SSRlocator	PV_GBa0046D07.r	Secondary hit	CATTATGAACAGTCAACGAT	CAATTCGTCTGTTGTATCTT	P	AT	180
BMr388	BMb3112L	SSRlocator	PV_GBa0054D14.r	Secondary hit	TTTTGACCGTAGTTAAAGAG	TAGAAAACCTGAAACACGAAT	P	AT	280
BMr389	BMb3115L	SSRlocator	PV_GBa0057H17.r	Secondary hit	TCCTAAATCATGGAACATA	CTAGCCATAGGAACAAAATA	P	AT	263
BMr390	BMb3118L	SSRlocator	PV_GBa0058C21.r	Secondary hit	AAATTGCATTACCCCTT	TTTCGTGATTTCTTGTAGT	NA	AT	114
BMr391	BMb3120L	SSRlocator	PV_GBa0058N23.r	Secondary hit	GAAAACAACTTAGCTCTTCA	TGAATATAAGCTAACCTTGC	P	AT	145
BMr392	BMb3122L	SSRlocator	PV_GBa0060D22.r	Secondary hit	AAAAACCTTAGGATCAAACCT	TTGACATCTCCTGTAAATC	P	AT	272
BMr393	BMb3123L	SSRlocator	PV_GBa0060E02.f	Secondary hit	GGGAAAACAATTTCTTATAGT	AAACCTTGCTTTTAATTCTA	P	AT	296
BMr394	BMb3124L	SSRlocator	PV_GBa0060G12.f	Secondary hit	TAAAATTTGTAGGTTATGCC	CCACATATTTTAAACAAGC	M	AT	224
BMr395	BMb3126L	SSRlocator	PV_GBa0061J14.f	Secondary hit	CTTAGACTGTTACACCACT	TAATTTTCTACTCGCATTTT	P	AT	238
BMr396	BMb3132L	SSRlocator	PV_GBa0062P06.r	Secondary hit	AAAATTTTCAATAGAACCCT	AGCATGATACAATCACTCTC	M	AT	248
BMr397	BMb3135L	SSRlocator	PV_GBa0066J11.f	Secondary hit	TAAGCTTAAGGAAAAACAGA	ATAGACAACCACGAAAATAA	P	AT	221
BMr398	BMb3162L	SSRlocator	PV_GBa0084M06.f	Secondary hit	AATCGAATTGTCATTTCTTA	TCATTAACCTGCATAATCT	P	AT	263
BMr399	BMb3163L	SSRlocator	PV_GBa0085F04.f	Secondary hit	AATTCATAAATTTGGTTGTG	TGAAAAGAGATTATTGGAGA	M	AT	291
BMr400	BMb3168L	SSRlocator	PV_GBa0086B02.f	Secondary hit	TGTTTAAACTAACACCCTT	ATTACAAATATGGGCAAGT	NA	AT	275
BMr401	BMb3177L	SSRlocator	PV_GBa0090O15.f	Secondary hit	TTCTTATTCCAAACAAAAAC	TGCAATTTTATTTCTCTTTC	P	AT	278
BMr402	BMb3184L	SSRlocator	PV_GBa0092E16.f	Secondary hit	TATAAAGTCATACTTCCCCA	CGAAAACGCTAAATATAATC	M	AT	253
BMr403	BMb3189L	SSRlocator	PV_GBa0093K22.r	Secondary hit	CTTAGGTTAAGCATCTCAAA	AGGAATGAATGCTAAATACA	P	AT	129
BMr404	BMb3195L	SSRlocator	PV_GBa0095B02.f	Secondary hit	TGTTGACTGTTTGTGTGTG	ATTATGCTATCAAGGAACAA	P	AT	245
BMr405	BMb3200L	SSRlocator	PV_GBa0096P07.r	Secondary hit	TGTAAAATGACTTGTTCCT	TTTTTGGGTGGCAAG	NA	AT	136
BMr406	BMb3201L	SSRlocator	PV_GBa0097F19.f	Secondary hit	AAAACAATATAATAGGCACG	TTTTTAATGGAATGAAAAGT	NA	AT	269
BMr407	BMb3225L	SSRlocator	PV_GBa0110F04.f	Secondary hit	ATGCGAGAGAAAAGACATA	AATTTTATATTTCTGCACCA	M	AT	108
BMr408	BMb3236L	SSRlocator	PV_GBa0113J08.r	Secondary hit	AATCGAATTGTCATTTCTTA	TCATTAACCTGCATAATCT	P	AT	256
BMr409	BMb3240L	SSRlocator	PV_GBa0118K14.r	Secondary hit	CGAAGTATAACAGTTGAAGG	AGTCAAAATTTTCGCTTCTA	NA	AT	295
BMr410	BMb3245L	SSRlocator	PV_GBa0122A13.r	Secondary hit	AATCGAATTGTCATTTCTTA	TCATTAACCTGCATAATCT	P	AT	263
BMr411	BMb3249L	SSRlocator	PV_GBa0125G15.f	Secondary hit	TCTTGATAGTCTCTGTACAC	TTAGTTGTTTCCTTCTTCAA	P	AT	298
BMr412	BMb3252L	SSRlocator	PV_GBa0118M02.r	Secondary hit	TCTGACATAGAGCAAAACAT	AAAAGTCATGTAATAAGCAA	P	AT	248
BMr413	BMb1002w	AMMD	PV_GBa0012M13.r	Secondary hit	GAATACAAGAACACGGTAAG	GACTAGATGACAATACATACCC	M	AT	111
BMr414	BMb1014w	AMMD	PV_GBa0039E05.r	Secondary hit	GAGAGAAAGGCTACTTGTCTA	GGAGCTCTAGTGATTTTGTA	M	AT	143
BMr415	BMb1018w	AMMD	PV_GBa0013M04.f	Secondary hit	CTCCACTTCTAACTTTTCAG	GATATGATCGTTGATGTCTC	P	AT	387
BMr416	BMb1034w	AMMD	PV_GBa0068F17.f	Secondary hit	CGTAGAAATTAGGATGGAG	AGATTACGCGTCTGACTAT	M	AT	339
BMr417	BMb1037w	AMMD	PV_GBa0118M02.r	Secondary hit	GAGTGACAATATCAAAGAGAGG	GCTAAAATTTGCTCTCTGC	P	TA	127
BMr418	BMb1039w	AMMD	PV_GBa0001L18.f	Secondary hit	GGGCAATTTGTAACATCC	AGGTAATAGAGCTCCTAAGTGA	P	AT	215
BMr419	BMb1056w	AMMD	PV_GBa0052O22.f	Secondary hit	CTCTCACTAACGGATAGATAAC	GTTGAGATGACCTTTCATAG	P	TA	345
BMr420	BMb1079w	AMMD	PV_GBa0056C08.f	Secondary hit	ACTACAGGAAAGACTAACACAG	TTTCTTAGAGAGAGGGTTTC	M	AT	347
BMr421	BMb1083w	AMMD	PV_GBa0091K23.r	Secondary hit	CATGTAGATTTAAGGTCAGC	GATTAAGATACTGACTGGAGAG	M	AT	381
BMr422	BMb1084w	AMMD	PV_GBa0072K07.r	Secondary hit	AACTCATGTACCAGCTTTC	AGACTGACTGGACTAGACTTC	NA	TA	183
BMr423	BMb1089w	AMMD	PV_GBa0048O14.f	Secondary hit	TTACTCCATCTACTTCTAGGG	GAGGTGTTAACTAACTGAGAT	M	TA	162
BMr424	BMb1090w	AMMD	PV_GBa0102M20.r	Secondary hit	CATGGGTAAGTGTGAGTTAT	AAAGAAGCGTGGACTTAG	M	AT	256
BMr425	BMb1092w	AMMD	PV_GBa0085J16.r	Secondary hit	GGTGAGAATTGTTTAGACG	GCTCAACTGACTTTTCTCTA	P	AT	168
BMr426	BMb1093w	AMMD	PV_GBa0108D13.f	Secondary hit	AACTCATAGTAGAGACACAACC	GAGATTAGGGTAGTAGATTGG	P	AT	256
BMr427	BMb1108w	AMMD	PV_GBa0052B14.r	Secondary hit	GACAATCTCGACACATCAT	GCGACAGTACAACCATATT	P	TA	398

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr428	BMb1114w	AMMD	PV_GBa0037O13.r	Secondary hit	CAAGCGGTTACACATTTTC	GTGAAGAGTACATCCACAAA	M	AT	387
BMr429	BMb1124w	AMMD	PV_GBa0025P05.f	Secondary hit	TAGAACCATGAGCTAGAAGA	CATCAGTCCATACATTATCC	M	AT	268
BMr430	BMb1125w	AMMD	PV_GBa0046B14.r	Secondary hit	GAGATGGCATTATAGACAAC	GTAGAATCATGGGAGATGA	P	TA	288
BMr431	BMb1154w	AMMD	PV_GBa0044C06.f	Secondary hit	GTGATAGATGTTGACGTGATAG	GAGAGGATCATATGGTAAGAAG	P	AT	395
BMr432	BMb1168w	AMMD	PV_GBa0003N24.r	Secondary hit	CTAGTCAGTCATTTGAGGTG	GCTCGTACATAAACTGTCAT	M	AT	110
BMr433	BMb1170w	AMMD	PV_GBa0095B01.r	Secondary hit	ATCTTGCTTGGATAGAAGAC	CTCTATGTAGAAGGTCTAAAGC	M	AT	213
BMr434	BMb1194w	AMMD	PV_GBa0037K24.f	Secondary hit	CATGAAGACGAGTAAGATACTG	GAAAAGCAGGTTGAGTCT	P	AT	193
BMr435	BMb1218w	AMMD	PV_GBa0038B02.f	Secondary hit	AGGTCTTTTACAGTCGTATG	CTTCTTGACAAAGACATAGC	M	TTA	178
BMr436	BMb1219w	AMMD	PV_GBa0100O06.r	Secondary hit	TACCGACCTCAACATCTAT	GATTACAAACCTGCGGTA	M	ATT	178
BMr437	BMb1225w	AMMD	PV_GBa0099H23.r	Secondary hit	TGAGTGTGCAGTGTTAATG	GAAGAAGATTCTGATGCTG	NA	ATT	386
BMr438	BMb1232w	AMMD	PV_GBa0031M21.f	Secondary hit	CAGATCTTGGATGAATCTAC	GTCTAGTTCCTTATGTTTGC	NA	TAA	372
BMr439	BMb1234w	AMMD	PV_GBa0118L12.r	Secondary hit	ACCTCTACTAAGAACTTCCTCT	CCCACAAATCTATATCCCTA	M	ATA	322
BMr440	BMb1245w	AMMD	PV_GBa0032I22.f	Secondary hit	CAGAGTCAACCGACAAAA	CAGTTAAGAGGGGAATAAGA	M	TAA	278
BMr441	BMb1247w	AMMD	PV_GBa0045L13.f	Secondary hit	GTCTTCAACTTCTCACTCTACT	CTAAGTGGTATTCTAGCATCAG	M	AAT	286
BMr442	BMb1248w	AMMD	PV_GBa0032J16.f	Secondary hit	CTTCTACCTTGTTTCAT	GTCAAAGAAACACTACACCTAC	M	ATT	145
BMr443	BMb1254w	AMMD	PV_GBa0013B22.r	Secondary hit	GTACAAACGTGAGAGAAGAT	GTAGCTAGATGAAACGACTTC	M	TAA	269
BMr444	BMb1255w	AMMD	PV_GBa0117P06.f	Secondary hit	GTTATATTACGCGGTCAAC	TATAGTAGCAACACTCATGC	NA	TAT	180
BMr445	BMb1257w	AMMD	PV_GBa0047P06.f	Secondary hit	TCCACAACCTAGTCATAGGTC	AAGTGTCTGTTGGTATAGG	M	AAT	311
BMr446	BMb1262w	AMMD	PV_GBa0095O18.f	Secondary hit	TGTGATCTTCGTACCTAAAC	GGAAAGGTATTAGGGTTTG	M	AAT	283
BMr447	BMb1276w	AMMD	PV_GBa0001I04.r	Secondary hit	ACTCGAAGGTAGTATACCAGT	CTCTATTGCGGCATAAAC	M	ATT	386
BMr448	BMb1289w	AMMD	PV_GBa0033K19.r	Secondary hit	GATATCTGATGGTGTTCTTG	GTATAGCTGATCTAACTTGGTC	M	ATT	268
BMr449	BMb1298w	AMMD	PV_GBa0026N08.f	Secondary hit	GCTGCAGTGATTAAGAAATG	AGGAGAACACAGTATAGCAA	M	TAA	123
BMr450	BMb1299w	AMMD	PV_GBa0100P14.f	Secondary hit	CTTTAATCTTCGGATAGAGC	GATATGGGTAGCAACAATC	M	TTA	132
BMr451	BMb1309w	AMMD	PV_GBa0009F04.f	Secondary hit	CACCTCTGATGATGTATGCT	CTGCTACAGGTGAAGTAATC	P	ATT	110
BMr452	BMb1323w	AMMD	PV_GBa0059M22.r	Secondary hit	ATTGTATGCACGAGTGGT	ACTCAGATCTTCACCCTACT	M	GA	206
BMr453	BMb1324w	AMMD	PV_GBa0041H09.f	Secondary hit	CCTATCACAGTCAATCTGTT	AGAGTACCTAAGTTCTTGTAGG	M	AG	334
BMr454	BMb1325w	AMMD	PV_GBa0094A16.r	Secondary hit	GAAGAGATCAGCTACACTAGAT	GACAACACTGTGAAGAAATC	M	AG	347
BMr455	BMb1327w	AMMD	PV_GBa0064O03.f	Secondary hit	TACATAGTGGAATACTCAGAGG	GACTTCTTTCCCTTCTACC	M	TC	355
BMr456	BMb1329w	AMMD	PV_GBa0043G15.f	Secondary hit	AGAAGTGAAGAAAGATGTCC	GAGTGTTCCTATGATCGTC	M	CT	318
BMr457	BMb1332w	AMMD	PV_GBa0071E10.r	Secondary hit	GTCTCCTATTAGACGATGTATG	TAAGTCTTGGTGAGTTCTTG	M	AG	349
BMr458	BMb1338w	AMMD	PV_GBa0084N09.r	Secondary hit	CTGTGACTAGGAAAGAGAAAG	GTAGGAATATCTTGAACCT	M	TC	176
BMr459	BMb1347w	AMMD	PV_GBa0027L14.f	Secondary hit	GTGCTCTTTGTTATGAGAGT	GGCAGTTTTGTAGTATTAC	M	GA	377
BMr460	BMb1350w	AMMD	PV_GBa0039F02.r	Secondary hit	GTTAGGAGACATTGTTGGTACT	AGCTGAGTGCTTTAGTAGTAGT	M	TC	160
BMr461	BMb1354w	AMMD	PV_GBa0062B09.r	Secondary hit	GAGCTCACTTCACAGATTT	ACGTTCCAGAGAGAAGTTACA	M	AG	319
BMr462	BMb1355w	AMMD	PV_GBa0082J17.f	Secondary hit	TAAAGATGAGGTCTTGTGTG	GACTATCCTTAGCTGACTCAC	M	TC	342
BMr463	BMb1357w	AMMD	PV_GBa0033B12.r	Secondary hit	GAGAAGACTAGAAGGAAGAAT	CTGTGACTAGGAAAGAGAAAC	M	GA	287
BMr464	BMb1368w	AMMD	PV_GBa0057N01.f	Secondary hit	CAAGAAACATGGGTCAG	ATAGGTTAGTGCTTCAACG	M	AG	179
BMr465	BMb1371w	AMMD	PV_GBa0018G18.r	Secondary hit	GTTCTTGTGAAAGAGATCAG	GTTCCAGAGAGAAGTTACAACAG	M	AG	247
BMr466	BMb1372w	AMMD	PV_GBa0004L19.r	Secondary hit	GAGTGAGGTACGCTTTTAC	GTGAGTACCTGAAATAGAGAGA	M	GA	241
BMr467	BMb1373w	AMMD	PV_GBa0099M10.r	Secondary hit	GATCTGTTATGCCTTGTTTC	GAGAAAGAGAGAGAAGTGAGA	M	TC	173
BMr468	BMb1375w	AMMD	PV_GBa0108J04.r	Secondary hit	AGAAAGGAGAGAGAAAACAC	ATACATCAGTTTCACACACC	P	AG	162
BMr469	BMb1376w	AMMD	PV_GBa0102J24.f	Secondary hit	TCTTGTTGAGAGATCAGAAG	GAGATGTATGACGATTAGAGAC	M	AG	309
BMr470	BMb1377w	AMMD	PV_GBa0094I19.r	Secondary hit	TCTGTTCCAGTAGCTTTTAG	AGAGTACCTAAGTTCTTGTAGG	M	GA	320

BMr	Equivalency to BMb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr471	BMb1380w	AMMD	PV_GBa0075K14.r	Secondary hit	GATTGCCTACTATCTCTCATAC	GAGTGTAGGCTTAGAACTCTT	M	TC	365
BMr472	BMb1382w	AMMD	PV_GBa0077D03.r	Secondary hit	TAACAGGTTGTTTCATAGCAG	TGTGAGTGATTACTAGTGAAC	M	GA	161
BMr473	BMb1389w	AMMD	PV_GBa0018K21.f	Secondary hit	GATTGCCTACTATCTCTCATAC	AGTGTAGGCTTAGGACTTTT	M	TC	349
BMr474	BMb1392w	AMMD	PV_GBa0017E18.r	Secondary hit	GGTAAGGAGTGAACCAGTAT	CTCTTTCTAGGAGACATACCTT	P	TC	393
BMr475	BMb1393w	AMMD	PV_GBa0040F12.r	Secondary hit	AGTCTGTAGATCTGAGGATAGA	GTGCTATTTACACCACAACT	M	AG	395
BMr476	BMb1407w	AMMD	PV_GBa0100G04.r	Secondary hit	GATTGTCTACTATCTCTCATGC	CTTTCTCTCTTTTTCTTTC	M	TC	318
BMr477	BMb1409w	AMMD	PV_GBa0095G05.f	Secondary hit	CTGACCTCACAGTCAAAAC	CATAACCTACTCCACTCTTAAC	M	AG	281
BMr478	BMb1412w	AMMD	PV_GBa0111C05.f	Secondary hit	GTAAGTGTGTAGTGTATTTCC	CCTATCACAGTCAATCTGTT	M	TC	280
BMr479	BMb1415w	AMMD	PV_GBa0059E23.r	Secondary hit	AGAGTACCTAAGTTCTTGTAGG	CCTATCACAGTCAATCTGTT	M	TC	334
BMr480	BMb1417w	AMMD	PV_GBa0043F23.f	Secondary hit	AAACAGAGGAGAACTCACTT	GTTTACAGAGAGAAGTTACAACAG	M	AG	298
BMr481	BMb1421w	AMMD	PV_GBa0096H19.r	Secondary hit	GATTGCCTACTATCTCTCATAG	GAGTGTAGGCTTAGAACTCTT	M	TC	366
BMr482	BMb1428w	AMMD	PV_GBa0093E11.f	Secondary hit	CTTAATCTCTCCCTGATTCT	CTCTACTGATTCTGAAGGTACA	M	TC	136
BMr483	BMb1431w	AMMD	PV_GBa0099C17.r	Secondary hit	GTAAGTGTGTAGTGTATTTCC	CTACATTCCATTCACTCAAG	M	CT	398
BMr484	BMb1436w	AMMD	PV_GBa0025N15.f	Secondary hit	GAGAATCTTGGTCAAAGG	AGAGCACACTTCACAGATT	M	CT	328
BMr485	BMb1437w	AMMD	PV_GBa0035I17.f	Secondary hit	AGAGTACCTAAGTTCTTGTAGG	CAACCTATCACAGTCAATCT	M	TC	337
BMr486	BMb1440w	AMMD	PV_GBa0083F18.r	Secondary hit	GGGAGAGAAATTAAGAGAGA	GGAAGAAACACATAAGTAGC	P	GA	292
BMr487	BMb1441w	AMMD	PV_GBa0110B08.r	Secondary hit	GAGGGAGCATAGAGAAAG	ACTAGAGAACACAAAGAGACAG	NA	AG	377
BMr488	BMb1447w	AMMD	PV_GBa0112K12.r	Secondary hit	GATTGCCTACTATCTCTCATAC	GAGTGTAGGCTTAGAACTCTT	M	TC	365
BMr489	BMb1449w	AMMD	PV_GBa0043P19.r	Secondary hit	TCTGTATAACCCTTGAAGT	CAAAGAAAATAGAGGAGAGG	M	TC	290
BMr490	BMb1460w	AMMD	PV_GBa0006D18.r	Secondary hit	GTTTTGACTCTCTTGTAGGT	GTTTTCTGTGTATAGCAGAGTC	M	AG	234
BMr491	BMb1467w	AMMD	PV_GBa0055C01.r	Secondary hit	CACAAGAAGTGTAGGCTTAG	ATGTGGCTAGTACAAGAGTAGT	M	GA	386
BMr492	BMb1477w	AMMD	PV_GBa0100J20.r	Secondary hit	AGAAGGGAGAGAAAGAAATA	CACATTCTCAAGAGTTAAGC	M	GA	372
BMr493	BMb1488w	AMMD	PV_GBa0018D16.r	Secondary hit	GTAGAAATGTTCTGAACTC	CTAAGGTCAGTGGAACTAAA	M	GA	241
BMr494	BMb1502w	AMMD	PV_GBa0057M05.f	Secondary hit	GCTTGAACAAGTAGTCATAGTC	GTAGGAAAGTAGGAGAAAGAGTC	M	GA	271
BMr495	BMb1523w	AMMD	PV_GBa0089H04.r	Secondary hit	ACGACACCATCTATACACTT	CTTGCCTAGCTTTCATATAC	P	CT	338
BMr496	BMb1555w	AMMD	PV_GBa0088B19.r	Secondary hit	CTTCTAGTCTTCTCCAGAC	GTTTACAGAGAGAAGTTACAACAG	M	AG	383
BMr497	BMb1556w	AMMD	PV_GBa0106C17.f	Secondary hit	CTTCTAGTCTTCTCCAGAC	GTTTACAGAGAGAAGTTACAACAG	M	AG	383
BMr498	BMb1744w	AMMD	PV_GBa0047L23.r	Secondary hit	GACCAAGCCCTCTATTAT	AGACTAGAAGAGAAGAGACAC	M	AG	135
BMr499	BMb1745w	AMMD	PV_GBa0079B07.r	Secondary hit	CTGTGACTAGGAAAGAGAAAG	GAGAAAGTGTGAGAGAGAACT	M	TC	369
BMr500	BMb1746w	AMMD	PV_GBa0089C20.f	Secondary hit	GGTGTGCATACATAGTTCTT	AAGAATATAGAGGGATGAGG	M	AT	170
BMr501	BMb1747w	AMMD	PV_GBa0049F14.r	Secondary hit	AAAGACTAAGAGGAACAAGC	GTAGAATAAGCAAGAGTAGGTC	M	TTCC	320
BMr502	BMb1753w	AMMD	PV_GBa0079H14.r	Secondary hit	GAGTATGTATTCACACCAAGTC	CATTTATCACGAAGTGGTAG	M	AGG	134
BMr503	BMb1754w	AMMD	PV_GBa0125K17.r	Secondary hit	CTATCCGAGATCAAGTCTG	GTCTTCTTGATCCTCTTG	M	GAA	243
BMr504	BMb1758w	AMMD	PV_GBa0071G13.r	Secondary hit	CAGGTACTTTGATAGGATACAC	CCCTTTCTAAATCTTACACC	P	AGA	169
BMr505	BMb1759w	AMMD	PV_GBa0082M04.r	Secondary hit	TAACCTGTGTACTACAACA	TGACATGTATCGTGAAGTG	P	CA	246
BMr506	BMb1763w	AMMD	PV_GBa0051L08.r	Secondary hit	ACTAAGACTAGCCTCACAAAG	ATACAAAGAGATAGCCTTCC	M	CA	398
BMr507	BMb1766w	AMMD	PV_GBa0083G15.r	Secondary hit	AGGGAGTGAAGAACCCTAAA	CAATTCATCTACCTTACGAG	M	TAAA	164
BMr508	BMb1786w	AMMD	PV_GBa0091D24.r	Secondary hit	CTCTACCTCTTCTGATCTTG	GAACCTCTCCATGTATACCAA	M	TTATT	344
BMr509	BMb1787w	AMMD	PV_GBa0110B08.r	Secondary hit	GAGATTAGGGAGAGTATGTGT	ACTAGAGAACACAAAGAGACAG	M	GA	313
BMr510	BMb1788w	AMMD	PV_GBa0117A07.r	Secondary hit	GATTGCCTACTATCTCTCATAC	GAGTGTAGGCTTAGAACTCTT	M	TC	365
BMr511	BMb1805w	AMMD	PV_GBa0051I15.r	Secondary hit	AGAACACTCTTGACACTAA	GGATTAAGTTAGGTACTCTCC	M	AAT	294
BMr512	BMb1820w	AMMD	PV_GBa0029C06.f	Secondary hit	GTCTTGTGAATGACCTTG	CCCTAGAAGACATAGAAGAGAT	M	CTTTT	309
BMr513	BMb1825w	AMMD	PV_GBa0021L23.f	Secondary hit	GTGAAAAGATTGAGTACCAG	CCTAGAGAGAGAAAGAGATTG	P	GAA	284

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr514	BMb1834w	AMMD	PV_GBa0089H04.r	Secondary hit	GTATAGTCGGTATCTCCTTTC	GGTACATTACACAGGAAGAA	P	AT	398
BMr515	BMb1842w	AMMD	PV_GBa0033H16.r	Secondary hit	GGAAAGAGTAGCATGATTG	ATAAGTTGTCTGGCACAAG	P	TA	337
BMr516	BMb1857w	AMMD	PV_GBa0038N23.r	Secondary hit	CCTATAAGTCGTTATGCTCTC	CTACTGTTTCATGCTTTGAGT	M	AGG	311
BMr517	BMb1858w	AMMD	PV_GBa0067I18.f	Secondary hit	GAAACCCCTAAAGGAGTACAT	CTTATCACCTCTACGATCTG	M	GAG	283
BMr518	BMb1860w	AMMD	PV_GBa0023B23.f	Secondary hit	GCCTTCTTCTCTAGTCTTATCT	GAACCTACCAATAACTAGTACC	M	TTC	343
BMr519	BMb1861w	AMMD	PV_GBa0029E09.r	Secondary hit	TGTAGCTCTTCTTGATCTTG	TAAGTAGTCCACTGTAACCTAC	P	AGA	273
BMr520	BMb1862w	AMMD	PV_GBa0079N20.f	Secondary hit	ACCTAGGACTTCCAATTCT	CAAGGGTATAGTGGTTTGTA	M	TCT	334
BMr521	BMb1863w	AMMD	PV_GBa0115A11.f	Secondary hit	ACTACCTTCTTTGACTTTCC	ATCTCTTCTATGTCTTCTAGGG	M	TCT	347
BMr522	BMb1864w	AMMD	PV_GBa0052N13.r	Secondary hit	TACCTTCCTCTCTGAACCTAAC	CTCTTCCTCTTGGTGATG	M	GAA	347
BMr523	BMb1865w	AMMD	PV_GBa0061M11.r	Secondary hit	CTACTTAGAAGGGTCAGAAAG	GAGAAGACTAGAAGGAAGAACT	M	TTC	264
BMr524	BMb1879w	AMMD	PV_GBa0057D04.f	Secondary hit	AACTACCAGCCTCACCAC	ATGTCGAACTTGACTTTCTC	M	CCT	292
BMr525	BMb1880w	AMMD	PV_GBa0107B09.r	Secondary hit	CTATACAAAGGAGGTGTCTTAG	GTTTAAAGGTTCTAGGTGAT	M	TCT	251
BMr526	BMb1881w	AMMD	PV_GBa0093M15.r	Secondary hit	CCTTCTAAACACTACTCTATG	AGTAGAGCAACTCACTCAAG	M	TCT	368
BMr527	BMb1882w	AMMD	PV_GBa0071I19.r	Secondary hit	ATTCATACTCAAGAGACGTG	CCATCTACCAACAACCTTATC	M	AGA	219
BMr528	BMb1890w	AMMD	PV_GBa0022N24.f	Secondary hit	AGAGGAAAACCTCCTCAAGT	GGTTCCTCTGATGATGATGT	P	AAG	194
BMr529	BMb1891w	AMMD	PV_GBa0014M10.f	Secondary hit	GGAAACCCAAGAGGAAAG	AGCTGATACATAAGGTGTGAAG	M	GAG	305
BMr530	BMb1892w	AMMD	PV_GBa0003N12.r	Secondary hit	GTAAGATCACTCAAGGCTTA	ACTAGACTAACCTCTTCAAGC	M	AGA	195
BMr531	BMb1893w	AMMD	PV_GBa0026D10.f	Secondary hit	GTCAACTACAAGTCTCAGTACC	TAAGAGTTCTCTCTCGAACC	M	CTT	297
BMr532	BMb1898w	AMMD	PV_GBa0002J11.r	Secondary hit	GATGATGAACCTCACTGCT	CAAGGGTATAACACTCAAAG	M	TCT	390
BMr533	BMb1899w	AMMD	PV_GBa0086H06.r	Secondary hit	CCTTTACTCTTTAGGTAGCAC	CCAGAAAGGTAAGTAGGAAG	M	CTT	169
BMr534	BMb1900w	AMMD	PV_GBa0108E20.f	Secondary hit	AGGAAACCCAAGAGGAAAG	CTCCAGCTGATACATACGAC	M	GAG	310
BMr535	BMb1905w	AMMD	PV_GBa0076A06.f	Secondary hit	AAGAGCCGTAGTCCCTCT	CTTCACCATTGACAGTAAACC	M	GAG	344
BMr536	BMb1906w	AMMD	PV_GBa0088M23.r	Secondary hit	AATTCTAGATGGTCTGACT	ACCTGCATCATCAGATAT	M	TCT	259
BMr537	BMb1912w	AMMD	PV_GBa0071G13.r	Secondary hit	CAGGTACTTTGATAGGATACAC	CCCTTTCTAAATCTTACACC	P	AGA	169
BMr538	BMb1913w	AMMD	PV_GBa0015D15.r	Secondary hit	GACTGCTCCCTATACACAC	TTAGTCATGTCTGCTCTTTC	NA	GAA	377
BMr539	BMb1914w	AMMD	PV_GBa0082J11.r	Secondary hit	GGAAACCCAAGAGGAAAG	CCCTCCATCTGATACAAA	M	GAG	311
BMr540	BMb1915w	AMMD	PV_GBa0015E19.r	Secondary hit	GACAGACCAATGTACTATACCA	TAAAGTCTGACCGATACAAG	M	CCT	323
BMr541	BMb1916w	AMMD	PV_GBa0106L20.r	Secondary hit	CTTCAGATGGTCTAGAATTG	AAATTAGAAGAGGTGAGACC	M	TTC	384
BMr542	BMb1917w	AMMD	PV_GBa0096P12.f	Secondary hit	GAAACCCATTAGGAGGTAT	GCCTTGAAATATGATAGAC	M	AAG	352
BMr543	BMb1918w	AMMD	PV_GBa0029K19.f	Secondary hit	CGAGAGAAAGGATACATACA	AGTTGTTGATAGCTCAGTTG	M	GAA	181
BMr544	BMb1919w	AMMD	PV_GBa0045D10.f	Secondary hit	TGTCTAGGGTATATTAGAGGAC	GAGCTAAAGATAGTGATTGG	M	TTC	372
BMr545	BMb1921w	AMMD	PV_GBa0120D07.r	Secondary hit	ATGTGTTAAGAGAGGGAAG	GATAAGAAGTGGTGAGAAGAG	M	AGA	288
BMr546	BMb1922w	AMMD	PV_GBa0108J17.r	Secondary hit	GTTCTTGAGTTTTGTTTCAG	GGACAATAGTTAGGCACCTT	M	TCT	303
BMr547	BMb1927w	AMMD	PV_GBa0007I22.r	Secondary hit	AGAGGAAAACCTCCTCAAGT	AAGTCGGAGACTCTGTTATC	M	AAG	351
BMr548	BMb1928w	AMMD	PV_GBa0004N20.r	Secondary hit	GAAACCCAAGAGGAAAGC	GATCAGAATTGGAGAGGTATG	M	GAG	388
BMr549	BMb1933w	AMMD	PV_GBa0116H06.r	Secondary hit	TGAGCCTTCTACTCTAGTCTTA	CCGAAACTAAAGACAACCTC	M	TTC	200
BMr550	BMb1934w	AMMD	PV_GBa0044J17.r	Secondary hit	GACCTCTCCTCTTACTCTTC	ATGAGACCTCTTCTCATCT	M	TTC	301
BMr551	BMb1935w	AMMD	PV_GBa0096L01.f	Secondary hit	GGTCTTAACGAGATTGTCTA	CTAGTAAATGGTTGCGTTAG	M	TCT	174
BMr552	BMb1948w	AMMD	PV_GBa0107N17.r	Secondary hit	CAAGTACTAAAGAGTTGTGCAG	TAGACTTGGACCTCTCGTA	M	AGG	125
BMr553	BMb1949w	AMMD	PV_GBa0025O05.f	Secondary hit	CTCACTCTACTTTCTGCTTCT	GTTGTCATGGTAGGAGGT	M	TTC	261
BMr554	BMb1951w	AMMD	PV_GBa0019L19.r	Secondary hit	CATGAAGCATAGATCAAGAC	TACTAAGGAGATGTGGGATAC	M	CTT	118
BMr555	BMb1952w	AMMD	PV_GBa0004B09.f	Secondary hit	TAGAGGAACTTACACTGCTAGA	TCATGAGAGTACCACTGATT	M	CTT	125
BMr556	BMb1960w	AMMD	PV_GBa0033M16.r	Secondary hit	GACCTCTTAAATGGTGAAAC	AGGCCTTGAGAATATGATAG	M	AGA	369

BMr	Equivalency to Bmb marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr557	BMb1961w	AMMD	PV_GBa0057N14.f	Secondary hit	ACTACCTTCTTTGACTTTCC	GCTCTCTTCTCTCTTTTAT	M	TCT	353
BMr558	BMb1972w	AMMD	PV_GBa0021P16.r	Secondary hit	CTTAGGAAACCAAAGAGG	AACTCAATCTTCTCTTGAGC	P	GAA	396
BMr559	BMb1979w	AMMD	PV_GBa0046F22.r	Secondary hit	AAACTCTGTGGTGGAGAT	CTCTTCTCTTCTCGTAACAA	NA	GAG	198
BMr560	BMb1980w	AMMD	PV_GBa0080D22.r	Secondary hit	TAAGCTATGTAACGACCAG	CTAGCTACTGAACCGAATAG	M	TCT	394
BMr561	BMb1983w	AMMD	PV_GBa0003G13.f	Secondary hit	TCTCCTCAGTCTAACTCTAATC	ATGAGAAGTGCTCTTGATAC	P	CTT	113
BMr562	BMb1986w	AMMD	PV_GBa0055I23.r	Secondary hit	GTTAGTCGTTTCGCTTTTAG	CTCTTCGTAATCCACTTACA	P	GAG	340
BMr563	BMb1987w	AMMD	PV_GBa0116B14.f	Secondary hit	TCCTACCTCTCTAGGATAGAC	GGATACAAGATGAACAACAC	M	TCT	305
BMr564	BMb1988w	AMMD	PV_GBa0010M05.r	Secondary hit	CTTCTATCTGTTCAAACGTC	CTAGTCTGTTATCCTGAACCTCT	M	CTT	260
BMr565	BMb1989w	AMMD	PV_GBa0037L16.r	Secondary hit	GAGCTTCTTCTCTAGTCTTATC	CTAAGATCAAGAACTCACCA	M	TTC	388
BMr566	BMb1994w	AMMD	PV_GBa0045O04.f	Secondary hit	GCTATGGTTCTTCAAAGATG	CACAGCAGATTCAGATAAAG	M	TTC	398
BMr567	BMb2004w	AMMD	PV_GBa0039O17.r	Secondary hit	CTGATATCTGTGTGTGTGC	GGCTAGAAGATACTCAAGAGA	P	TTC	355
BMr568	BMb2006w	AMMD	PV_GBa0052F16.f	Secondary hit	AGTGTTAGGGTTAGACCTTC	CTTGAGAGAGCTTGAACAT	M	AAG	183
BMr569	BMb2007w	AMMD	PV_GBa0104O23.r	Secondary hit	CAAGTTGGTATCTATCTAGCC	GATGGATTAGGTAAGAGAGTG	M	GAA	282
BMr570	BMb2014w	AMMD	PV_GBa0057A09.r	Secondary hit	CTCTACCTCTTCTTGACTTTG	CACTTTCCTCACTAAACTAGG	M	AAG	241
BMr571	BMb2015w	AMMD	PV_GBa0115O21.r	Secondary hit	AGGAAACCTAAGAGGAAAG	CTCTCCAGCTGTTACATAAG	M	GAG	312
BMr572	BMb2018w	AMMD	PV_GBa0059L24.f	Secondary hit	GGAAACCAAAGAGGAAAG	CTCCAGCTGATACATAAGG	M	GAA	296
BMr573	BMb2019w	AMMD	PV_GBa0003M23.f	Secondary hit	ATTTGAGATACCTTCTACCG	GATTTGAAGGGAGTAGAGAA	M	TTC	163
BMr574	BMb2032w	AMMD	PV_GBa0063E16.r	Secondary hit	CTTTGTTCTCTCTGTTTCAG	AGAGTATGGAAAGAAGGAAG	P	GAA	323
BMr575	BMb2036w	AMMD	PV_GBa0079H14.r	Secondary hit	GAGTATGTATTCACACCAAGTC	CATTTATCACGAAGTGGTAG	M	AGG	134
BMr576	BMb2042w	AMMD	PV_GBa0095O18.r	Secondary hit	GTCTCTACTTTGAGATGACTTC	CAAATGGAGGAAAGACTC	M	TCT	380
BMr577	BMb2064w	AMMD	PV_GBa0029N18.r	Secondary hit	AACCTCGACTCTCTTAACCT	GAGTGAAGATGAAAGGTACA	M	TTC	228
BMr578	BMb2069w	AMMD	PV_GBa0092C17.r	Secondary hit	GTTTGTGTTGAAGGAGCTA	GAGATGATTCTTCCAATCTC	M	AGA	208
BMr579	BMb2093w	AMMD	PV_GBa0021L23.f	Secondary hit	GTGAAAAGATTGAGTACCAG	CCTAGAGAGAGAAAGAGATTG	P	GAA	284
BMr580	BMb2101w	AMMD	PV_GBa0047O24.f	Secondary hit	CATCCTCTCTTCTAGTCTT	CTTCAAGTGAGGTCTCTTAGT	M	CTT	379
BMr581	BMb2136w_c106	AMMD	PV_GBa0077I24.f	Secondary hit	AGTCTGTAGATCTGAGGATAGA	CTAGGTTGGTGTTTTAGGT	M	GAA	347
BMr582	BMb2162w_c8	AMMD	PV_GBa0125J21.r	Secondary hit	GTAACCTCACCTCCCTTACTT	CCTGTACCTCTTCTTGATCT	P	TCT	262
BMr583	BMb2163w_c8	AMMD	PV_GBa0084J19.r	Secondary hit	AGTACACATTAGGATCACTCTC	CTCAAAAGGCAACTCTCT	M	GAT	321
BMr584	BMb2164w_c8	AMMD	PV_GBa0086I11.r	Secondary hit	CACCTATAAGGTTTCACTCA	GACTCTAGATGAACAGATCG	M	TCA	313
BMr585	BMb2165w_c8	AMMD	PV_GBa0079F10.f	Secondary hit	GCATATATCTCCCGCTAT	TCTAGATGAACAGATTGAGG	M	TCA	236
BMr586	BMb2166w_c8	AMMD	PV_GBa0012D02.r	Secondary hit	AGTACACATTAGGATCACTCTC	GTTTCATCAAAACCAGGAG	M	ATG	199
BMr587	BMb2167w_c8	AMMD	PV_GBa0013G18.r	Secondary hit	AGTACACATTAGGATCACTCTC	CTCAAAAGGCAACTCTCT	M	GAT	321
BMr588	BMb2168w_c9	AMMD	PV_GBa0102G22.f	Secondary hit	CTCTATCTCTTCATCTCTTCC	GTGTGGTTTTCTGTACCTAA	M	TCA	356
BMr589	BMb2169w_c9	AMMD	PV_GBa0077I24.f	Secondary hit	AGTCTGTAGATCTGAGGATAGA	CTAGGTTGGTGTTTTAGGT	M	GAA	362
BMr590	BMb2170w_c9	AMMD	PV_GBa0062F16.f	Secondary hit	TGAACTTTCTCTCAGATGTC	AGATAGAGGAAAAGCAGAGT	M	TG	170
BMr591	BMb2171w_c9	AMMD	PV_GBa0058C05.f	Secondary hit	GAATCATGTAAGAGATGGTG	CTTAAGTAGTCTTTGTGACTC	M	TG	379
BMr592	BMb2172w_c9	AMMD	PV_GBa0045L15.f	Secondary hit	AGGAAACCTAAGAGGAAAG	CAGTAATCAGAATTGGAGAG	M	GAG	394
BMr593	BMb1066w	AMMD	PV_GBa0073P10.r	Primary hit	GACTGTGTTTAGTCAAAGGA	CCTCCTATCAGCAAGTATAA	M	TA	290
BMr594	BMb1072w	AMMD	PV_GBa0012F05.r	Primary hit	CTACATAGCCGTTTAGAAGA	GTGGAGGTAGAGGATAAAAT	NA	AT	375
BMr595	BMb1073w	AMMD	PV_GBa0086D22.r	Primary hit	GAGCCTGAAAGACAAAGTA	CCTAGGTAGTTTCTGTAAATC	P	TA	345
BMr596	BMb1074w	AMMD	PV_GBa0076P05.r	Primary hit	ATCCCATCATAACAAGCTAC	ACTAACCACACTAACCCTACT	P	TA	211
BMr597	BMb1102w	AMMD	PV_GBa0088P05.r	Primary hit	TGGTAGAGCTTCTTGAACCTA	GGAGATCAAACAAATCTCTG	P	AT	159
BMr598	BMb1103w	AMMD	PV_GBa0031P07.r	Primary hit	GGAGTTCTTCCCTATATCAT	AGTACCTGACATCGTTTATA	P	TA	290
BMr599	BMb1155w	AMMD	PV_GBa0015B24.f	Primary hit	GCAGCTACAGAAGACAAATA	CAGTAATCTGAACTAGTCTGG	P	AT	147

BMr	Equivalency to BMB marker	Program used to identify the SSR	ID Clone	Primary/secondary hit	Left Sequence	Right Sequence	GxG	Motif	Product size
BMr600	BMb1178w	AMMD	PV_GBa0031L15.f	Primary hit	GAATGTGAAGACTCTCAAAG	TAAACCATCCAGTATACACC	M	AT	261
BMr601	BMb1195w	AMMD	PV_GBa0082M19.f	Primary hit	AGGAACAGAAGATATGCAG	GCTAGTAGGTAATTTGACACC	M	AT	279
BMr602	BMb1246w	AMMD	PV_GBa0086O01.f	Primary hit	CTGCACTTGTACATCCAC	CTCTCATACATACGGATACAC	P	TTA	102
BMr603	BMb1268w	AMMD	PV_GBa0002H14.f	Primary hit	GTTGCTGATCACTCTCTTT	AGTCTTCTGTATTGGGAAGT	M	ATA	363
BMr604	BMb1302w	AMMD	PV_GBa0007O20.f	Primary hit	GAGAGAAGCACCTAGCAT	CTGCTAGACACATGATACAAG	NA	ATA	396
BMr605	BMb1453w	AMMD	PV_GBa0083M04.r	Primary hit	GTTTTAACTCTCTGGAGGT	GCTGATAATGCTCAGAAAG	M	AG	373
BMr606	BMb1462w	AMMD	PV_GBa0089J18.f	Primary hit	TGTCTTTCTGGAGTCATGT	ACTTACATGGTAGTCCTTGAG	M	GA	134
BMr607	BMb1484w	AMMD	PV_GBa0092F22.r	Primary hit	CCTGTTCCCACTAGTTAGTAT	CAGGAGATGAAGAAGAAGA	M	TC	300
BMr608	BMb1487w	AMMD	PV_GBa0049F18.r	Primary hit	GGGAGAGAAAATTAAGAGAG	TATCAAGACTACTTCGCATC	P	GA	383
BMr609	BMb1490w	AMMD	PV_GBa0001G24.f	Primary hit	TTAGAGTGTGGAGAGTGAG	TAGTTACGATGAGTGGAATC	M	AG	246
BMr610	BMb1510w	AMMD	PV_GBa0016J14.r	Primary hit	CTCATCCTCAGATAACAGAA	TAAGTCCAGGCCAACTACTA	P	TC	217
BMr611	BMb1514w	AMMD	PV_GBa0006E15.f	Primary hit	CTTTCAAACAGAACTCAC	GGTCCCAATACAATAGAAG	M	AG	258
BMr612	BMb1527w	AMMD	PV_GBa0029C13.f	Primary hit	ATTAGATTCTCGAACCTCTG	GAAGGCAAGTGTAAGAGTA	P	AG	119
BMr613	BMb1559w	AMMD	PV_GBa0070A17.r	Primary hit	GAAATATGATGGACACACTC	CACCAACAGATATCATCACT	P	TC	295
BMr614	BMb1564w	AMMD	PV_GBa0079J05.f	Primary hit	GAGGCTTTTCACGTATCTA	GTTTAATACACTCCATGCTG	P	AT	202
BMr615	BMb1666w	AMMD	PV_GBa0112G14.r	Primary hit	GATGAGTGTCTCCACTTTTA	CTCTTTCTTAATGACCACTC	NA	TA	338
BMr616	BMb1678w	AMMD	PV_GBa0112M13.f	Primary hit	GAGCCTGAAAGACAAAAGTA	CCTAGGTAGTTTCTGTAAATC	P	TA	345
BMr617	BMb1739w	AMMD	PV_GBa0046L23.f	Primary hit	CACTACACCAACAAATTCC	TGATATCTCCATTACACACG	P	TTA	348
BMr618	BMb1793w	AMMD	PV_GBa0007D06.r	Primary hit	GCTACTTTTCAGAGGTTTGTA	CCATAGACTCTTGCTTTTG	M	TTTC	315
BMr619	BMb1802w	AMMD	PV_GBa0092F22.r	Primary hit	GATGACGAAATCTCACCT	CAGGAGATGAAGAAGAAGA	M	TAA	374
BMr620	BMb1822w	AMMD	PV_GBa0016J14.r	Primary hit	GCCTGGACTTATTTAGTTACTC	CTGCATATAAAGTCATCCAG	M	AT	325
BMr621	BMb1850w	AMMD	PV_GBa0024N10.f	Primary hit	GACAGCTATGATGATTCAGT	CAGTATCATTCGAAGTAAGC	M	ATGA	277
BMr622	BMb1875w	AMMD	PV_GBa0107P10.f	Primary hit	GTAGACGATAGGTCAAACAA	GTCAACTTTACTTCTTGACAC	M	CTT	371
BMr623	BMb1889w	AMMD	PV_GBa0043P05.r	Primary hit	AGTAAGTACTAAACCGAGTCAC	ACACGCCTATATAATAGCTC	M	TCT	235
BMr624	BMb2020w	AMMD	PV_GBa0101P24.r	Primary hit	GTGTTGTGCTCAGTTTGT	CACGGTAAACAGTGAAAAC	M	CTC	231
BMr625	BMb2021w	AMMD	PV_GBa0091F12.f	Primary hit	AGATCCTCATACACACCATA	CACGGTAAACAGTGAAAAC	M	CTC	358
BMr626	BMb2030w	AMMD	PV_GBa0056F19.r	Primary hit	CGAAGGATATTGAGTGAGTA	CAAAGGTTCAAGTCTTCAC	M	TTC	274
BMr627	BMb2063w	AMMD	PV_GBa0013A18.r	Primary hit	AGGAAAACCTCTCCAAGT	AAGTCGGAGACTCTGTTATC	M	AAG	335
BMr628	BMb2065w	AMMD	PV_GBa0106H04.f	Primary hit	CTTAGTGACATACTCAGAGGTT	ATCTGGAAAAGAGGATAGC	P	TCT	388
BMr629	BMb2111w	AMMD	PV_GBa0100I18.f	Primary hit	GAGCTTCTTCTAGTCTTATC	ACTCACCAATAACAAGTACC	M	TTC	372

Annex 3- 2. BMr mapped discriminating contig, singleton and programm.

Linkage Group	Contig en cada GL	BMr mapeados ubicados en contig			Total BMr en contig	BMr en singleton mapeados			BMr de singleton mapeados
		Batchprimer3	SSRLocator	AMMD		Batchprimer3	SSRLocator	AMMD	
b01	8	8	1	3	12			2	2
b02	7	4	3	2	9	2			2
b03	3	6	2	0	8				0
b04	7	11	4	12	27	4	3	8	14
b05	5	2	2	3	7	1			1
b06	4	3	0	1	4				0
b07	7	5	3	3	11				0
b08	8	5	4	2	11				0
b09	4	3	0	3	6				0
b10	8	9	3	8	20				0
b11	11	7	0	8	15	2		4	6
Total	72	63	22	45	130	9	3	14	25

Annex 3- 3.BMr who showed a conflict in the mapped pattern.

BMr	Contig	LOD score	LG of the BMr	LG of other markers in the same contig
BMr220	42	21.98	b04	b01
BMr410	43	24.99	b08	b07
BMr375	71	24.08	b10	There were no more BMr in this contig
BMr393	71	22.88	b09	There were no more BMr in this contig
BMr245	147	22.58	b01	There were no more BMr in this contig
BMr474	147	25.29	b11	There were no more BMr in this contig
BMr419	199	24.99	b04	b07
BMr270	244	19.87	b10	There were no more BMr in this contig
BMr561	244	22.58	b08	There were no more BMr in this contig
BMr567	349	25.29	b05	b01
BMr613	2913	24.08	b07	b11

References

- Abajian, C. 1994. SPUTNIK. <http://abajian.net/sputnik/>.
- Balardin, R.S., A.M. Jarosz, and J.D. Kelly. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. *Phytopathology* 87(12): 1184–1191.
- Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27(2): 573–580.
- Blair, M., H. Buendía, M. Giraldo, I. Métais, and D. Peltier. 2008. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris*; L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 118: 91–103.
- Blair, M.W., F. Pedraza, H.F. Buendia, E. Gaitán-Solís, S.E. Beebe, P. Gepts, and J. Tohme. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris*; L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107: 1362–1374.
- Blair, M., M. Torres, M. Giraldo, and F. Pedraza. 2009. Development and diversity of Andean-derived, gene-based microsatellites for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology* 9(1): 100.
- Blair, M.W., T.A. Sandoval, G.V. Caldas, S.E. Beebe, and M. Páez. 2009a. Quantitative Trait Locus Analysis of Seed Phosphorus and Seed Phytate Content in a Recombinant Inbred Line Population of Common Bean. *Crop Sci.* 49: 237–246.
- Broman, K.W. 2009. A guide to QTL mapping with R/qtl / (S Sen, Ed.). Springer,, New York :
- Brosius, J., and S.J. Gould. 1992. On “genomenclature”: a comprehensive (and respectful) taxonomy for pseudogenes and other “junk DNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(22): 10706–10710.
- Cannon, S.B., H. Zhu, A.M. Baumgarten, R. Spangler, G. May, D.R. Cook, and N.D. Young. 2002. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *Journal of Molecular Evolution* 54(4): 548–562.
- Castelo, A.T., W. Martins, and G.R. Gao. 2002. TROLL—Tandem Repeat Occurrence Locator. *Bioinformatics* 18(4): 634–636.
- Castiglioni, P., C. Pozzi, M. Heun, V. Terzi, J. Moher, W. Rohde, and P. Salamini. 1998. An AFLP based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics* 49: 2039–2056.

- Checa, O., and M. Blair. 2008. Mapping QTL for climbing ability and component traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*; L.). *Molecular Breeding* 22: 201–215.
- Checa, O.E., and M.W. Blair. 2012. Inheritance of Yield-Related Traits in Climbing Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Sci.* 52(5): 1998–2013.
- Clamp, M., J. Cuff, S.M. Searle, and G.J. Barton. 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20(3): 426–427.
- Collins, N., R. Park, W. Spielmeyer, J. Ellis, and A.J. Pryor. 2001. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. *Genome* 44(3): 375–381.
- Cooley, M.B., S. Pathirana, H.-J. Wu, P. Kachroo, and D.F. Klessig. 2000. Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 Family of Resistance Genes Confer Resistance to Both Viral and Oomycete Pathogens. *The Plant Cell Online* 12(5): 663–676.
- Córdoba, S.J.M. 2009. Desarrollo de marcadores microsatelitales a partir de las secuencias BAC-end de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y ubicación en los mapas genético y físico = (Development of microsatellite markers from the common bean BAC-ends and placement in the genetic and physical maps). Tesis (Master en Ciencias Agrarias.). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, DC, CO. 148 p.
- Cordoba, J., C. Chavarro, J. Schlueter, S. Jackson, and M. Blair. 2010. Integration of physical and genetic maps of common bean through BAC-derived microsatellite markers. *BMC Genomics* 11(1): 436.
- Darvasi, A., A. Weinreb, V. Minke, J.I. Weller, and M. Soller. 1993. Detecting Marker-QTL Linkage and Estimating QTL Gene Effect and Map Location Using a Saturated Genetic Map. *Genetics* 134(3): 943–951.
- Debouck, D.G., O. Toro, O.M. Paredes, W.C. Johnson, and P. Gepts. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. *Economic Botany* 47(4): 408–423.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. En: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Consulta: Noviembre, 2011.
- Ferrier-Cana, E., V. Geffroy, C. Macadré, F. Creusot, P. Imbert-Bolloré, M. Sévignac, and T. Langin. 2003. Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 106(2): 251–261.
- Ferrier-Cana, E., C. Macadré, M. Sévignac, P. David, T. Langin, and V. Geffroy. 2005. Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC-NBS-LRR gene JA1tr of *Phaseolus vulgaris*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 110(5): 895–905.

- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev Phytopathol* 9: 275–296.
- Freyre, R., P.W. Skroch, V. Geffroy, A.F. Adam-Blondon, A. Shirmohamadali, W.C. Johnson, V. Llaca, R.O. Nodari, P.A. Pereira, S.M. Tsai, J. Tohme, M. Dron, J. Nienhuis, C.E. Vallejos, and P. Gepts. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theoretical and Applied Genetics* 97(5/6): 847–856.
- Galeano, C., A. Fernandez, N. Franco-Herrera, K. Cichy, McClean, Vanderleyden, and M. Blair. 2011. Saturation of an Intra-Gene Pool Linkage Map: Towards a Unified Consensus Linkage Map for Fine Mapping and Syteny Analysis in Common Bean. *PLoS ONE* 6(12): e28135.
- Garzón, L.N., M.W. Blair, O.A. Oliveros, B. Rosen, G.A. Ligarreto, J. Gao, and D. Cook. Submitted. Isolation and characterization of NBS resistance gene homologues in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology*.
- Gebhardt, C., and J.P.T. Valkonen. 2001. ORGANIZATION OF GENES CONTROLLING DISEASE RESISTANCE IN THE POTATO GENOME. *Annual Review of Phytopathology* 39(1): 79–102.
- Geffroy, V., F. Creusot, J. Falquet, M. Sévignac, A.F. Adam-Blondon, H. Bannerot, P. Gepts, and M. Dron. 1998. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* 96(3/4): 494–502.
- Geffroy, V., C. Macadré, P. David, A. Pedrosa-Harand, M. Sévignac, C. Duga, and T. Langin. 2009. Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181(2): 405–419.
- Geffroy, V., M. Sévignac, J.C.F. de Oliveira, G. Fouilloux, P. Skroch, P. Thoquet, P. Gepts, T. Langin, and M. Dron. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(3): 287–296.
- Geffroy, V., D. Sicard, J.C.F. de Oliveira, M. Sévignac, S. Cohen, P. Gepts, C. Neema, T. Langin, and M. Dron. 1999. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(9): 774–784.
- Geffroy, V., M. Sévignac, p. Billant, M. Dron, and T. Langin. 2008. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS* 116(3): 407–415.

- Gepts, P. 1998. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. 33(7): 1124–1130.
- Gepts, P., F.J.L. Aragão, E. de Barros, M.W. Blair, R. Brondani, W. Broughton, I. Galasso, G. Hernández, J. Kami, P. Lariguet, P. McClean, M. Melotto, P. Miklas, P. Pauls, A. Pedrosa-Harand, T. Porch, F. Sánchez, F. Sparvoli, and Yu KangFu. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. p. 113–143. *In* Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, Volume 1. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.
- Godwin, M.J. 2003. Molecular Mapping of Disease-Related Expressed Sequence Tags and Resistance Gene Analogues in Soybean. Master thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia. 88 p.
- Guzmán, P., Donado, M.R., and Galvez, G.E. 1979a. Pérdidas económicas causadas por la antracnosis del frijol *Phaseolus vulgaris* en Colombia. Turrialba 29: 65–67.
- Guzmán, P., Donado, M.R., and Galvez, G.E. 1979b. Control químico de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en Colombia. Control químico de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en Colombia. Turrialba.
- Hall, A.E. 2003. Future directions of the Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program. Field Crops Research 82(2/3): 233–239.
- Hanai, L.R., L. Santini, L.E.A. Camargo, M.H.P. Fungaro, P. Gepts, Tsai SiuMui, and M.L.C. Vieira. 2010. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. Molecular Breeding 25(1): 25–45.
- Haussmann, B.I.G., D.E. Hess, N. Seetharama, H.G. Welz, and H.H. Geiger. 2002. Construction of a combined sorghum linkage map from two recombinant inbred populations using AFLP, SSR, RFLP, and RAPD markers, and comparison with other sorghum maps. Theor. Appl. Genet. 105: 629–637.
- Hulbert, S.H., C.A. Webb, S.M. Smith, and Q. Sun. 2001. RESISTANCE GENE COMPLEXES: Evolution and Utilization. Annual Review of Phytopathology 39(1): 285–312.
- Jamison, D.C., J.W. Thomas, and E.D. Green. 2000. ComboScreen facilitates the multiplex hybridization-based screening of high-density clone arrays. Bioinformatics 16(8): 678–684.
- Jiang, S.-M., J. Hu, W.-B. Yin, Y.-H. Chen, R. Wang, and Z.-M. Hu. 2005. Cloning of resistance gene analogs located on the alien chromosome in an addition line of wheat-Thinopyrum intermedium. TAG Theoretical and Applied Genetics 111: 923–931.

- Jones, J.D.G., and J.L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117): 323–329.
- Katoh, K., K. Kuma, H. Toh, and T. Miyata. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33(2): 511–518.
- Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas, and D.P. Coyne. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research* 82(2/3): 135–154.
- Kelly, J.D., and V.A. Vallejo. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience* 39(6): 1196–1207.
- Koreth, J., J.J. O'Leary, and J. O'D. McGee. 1996. Microsatellites and PCR genomic analysis. *The Journal of Pathology* 178(3): 239–248.
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1(2): 174 – 181.
- Leal-Bertioli, S., A. Jose, D. Alves-Freitas, M. Moretzsohn, P. Guimaraes, S. Nielsen, B. Vidigal, R. Pereira, J. Pike, A. Favero, M. Parniske, R. Varshney, and D. Bertioli. 2009. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *BMC Plant Biology* 9(1): 112.
- Leister, D. 2004. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends Genet* 20(3): 116–122.
- Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini, and C. Gebhardt. 1996. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genet* 14: 421–429.
- Leister, D., J. Kurth, D.A. Laurie, M. Yano, T. Sasaki, K. Devos, A. Graner, and P. Schulze-Lefert. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(1): 370–375.
- López, C.E., I.F. Acosta, C. Jara, F. Pedraza, E. Gaitán-Solís, G. Gallego, S. Beebe, and J. Tohme. 2003. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93(1): 88–95.
- Maia, L.C. da, D.A. Palmieri, V.Q. de Souza, M.M. Kopp, F.I.F. de Carvalho, and A. Costa de Oliveira. 2008. SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. *International Journal of Plant Genomics* 2008 Available at <http://dx.doi.org/10.1155/2008/412696>.

- Martins, W., D. de Sousa, K. Proite, P. Guimarães, M. Moretzsohn, and D. Bertioli. 2005. New softwares for automated microsatellite marker development. *Nucleic Acids Research* 34(4): e31.
- McIntyre, C.L., R.E. Casu, J. Drenth, D. Knight, V.A. Whan, B.J. Croft, D.R. Jordan, and J.M. Manners. 2005. Resistance gene analogues in sugarcane and sorghum and their association with quantitative trait loci for rust resistance. *Genome* 48(3): 391–400.
- Meyers, B.C., A. Kozik, A. Griego, H.H. Kuang, and R.W. Michelmore. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(4): 809–834.
- Michelmore, R.W., and B.C. Meyers. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* 8(11): 1113–1130.
- Miklas, P.N. 2010. SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). http://www.css.msu.edu/bic/PDF/SCAR_Markers_2010.pdf (Verified Oct. 2011).
- Miklas, P.N., J.D. Kelly, S.D. Beebe, and M.W. Blair. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105–131.
- Miklas, P.N., and S.P. Singh. 2007. Genome mapping and molecular breeding in plants. Vol. 3. Pulses, Tuber, and sugar crops. C. Kole (ed.). Springer-Verlag, Berlin. Chapter Pp. 1-31.
- Miller, R.N.G., D.J. Bertioli, F.C. Baurens, C.M.R. Santos, P.C. Alves, N.F. Martins, R.C. Togawa, M.T. Souza Júnior, and G.J. Pappas Júnior. 2008. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biology* 8(15): (30 January 2008).
- Monosi, B., R.J. Wisser, L. Pennill, and S.H. Hulbert. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 109(7): 1434–1447.
- Morgante, M., M. Hanafey, and W. Powell. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30(2): 194–200.
- Mutlu, N., P. Miklas, and D. Coyne. 2006. Resistance Gene Analog Polymorphism (RGAP) Markers Co-Localize with Disease Resistance Genes and QTL in Common Bean. *Molecular Breeding* 17: 127–135.
- Nimchuk, Z., T. Eulgem, B.F. Holt, and J.L. Dangl. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* 37: 579–609.

- Ochoa, I.E., M.W. Blair, and J.P. Lynch. 2006. QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Crop Science* 46(4): 1609–1621.
- Pastor-Corrales, M.A., O.A. Erazo, E.I. Estrada, and S.P. Singh. 1994. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. *Plant Disease* 78(10): 959–962.
- Perrine, D., N.W.G. Chen, A. Pedrosa-Harand, V. Thareau, M. Sévignac, S.B. Cannon, D. Debouck, T. Langin, and V. Geffroy. 2009. A Nomadic Subtelomeric Disease Resistance Gene Cluster in Common Bean. *Plant Physiology* 151(3): 1048–1065.
- Prioul-Gervais, S., G. Deniot, E.-M. Receveur, A. Frankewitz, M. Fourmann, C. Rameau, M.-L. Pilet-Nayel, and A. Baranger. 2007. Candidate genes for quantitative resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 114(6): 971–984.
- Radwan, O.E., T.A. Ahmed, and S.J. Knapp. 2010. Phylogenetic analyses of peanut resistance gene candidates and screening of different genotypes for polymorphic markers. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17: 43–49.
- Rivkin, M.I., C.E. Vallejos, and P.E. McClean. 1999. Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome* 42(1): 41–47.
- Rodrigues, T.B., and J.B. Santos. 2006. Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. *Genetics and Molecular Biology* 29: 345 – 352.
- Schlueter, J.A., J.L. Goicoechea, K. Collura, N. Gill, J.Y. Lin, Y.S. Yu, D. Kudrna, A. Zuccolo, C.E. Vallejos, M. Muñoz-Torres, M.W. Blair, J. Tohme, J. Tomkins, P. McClean, R.A. Wing, and S.A. Jackson. 2008. BAC-end sequence analysis and a draft physical map of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genome. *Tropical Plant Biology* 1(1): 40–48.
- Schwartz, H.F., and M.A. Pastor-Corrales. 1989. Bean production problems in the tropics. 2nd edition. CIAT, Cali, Colombia. 654 p.
- Schwartz, H.F., J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster. 2005. Compendium of bean diseases. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul.
- Scott, K.D. 2001. Microsatellites derived from ESTs, and their comparison with those derived by other methods. p. 225–237. *In* CABI, Wallingford.
- Sharma, P.C., A. Grover, and G. Kahl. 2007. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology* 25(11): 490 – 498.

- Singh, K., M. Ghai, M. Garg, P. Chhuneja, P. Kaur, and T. Schnurbusch. 2007. An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* × *T. monococcum* RIL population. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 301–312.
- Singh, S.P., R. Nodari, and P. Gepts. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. *Crop Science* 31(1): 19–23.
- Smit, A.F.A., R. Hubley, and P. Green. 1996. RepeatMasker Open- 3.0. <http://www.repeatmasker.org>.
- Sun, D., Y. Hu, L. Zhang, and Y. Mo. 2009. Cloning and analysis of fusarium wilt resistance gene analogs in “Goldfinger” banana. *Molecular Plant Breeding (CHN)* 7(6): 1215–1222.
- Sweigard, J.A., A.M. Carroll, S. Kang, L. Farrall, F.G. Chumley, and B. Valent. 1995. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *The Plant Cell Online* 7(8): 1221–33.
- Tanyolac, B., S. Ozatay, A. Kahraman, and F. Muehlbauer. 2010. Linkage mapping of lentil (*Lens culinaris* L.) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 2(1): 001–006.
- Tarr, D.E., and H. Alexander. 2009. TIR-NBS-LRR genes are rare in monocots: evidence from diverse monocot orders. *BMC Research Notes* 2(1): 197.
- Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, and S. McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research* 11(8): 1441–1452.
- Thiel, T., W. Michalek, R.K. Varshney, and A. Graner. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106(3): 411–422.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673–4680.
- Totad, A.S., B. Fakrudin, and M.S. Kuruvashetti. 2005. Isolation and characterization of resistance gene analogs (RGAs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Euphytica* 143(1/2): 179–188.
- Vallejos, C.E., G. Astua-Monge, V. Jones, T.R. Plyler, N.S. Sakiyama, and S.A. Mackenzie. 2006. Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 172(2): 1229–1242.

- Vallejos, C.E., N.S. Sakiyama, and C.D. Chase. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131(3): 733–740.
- Varshney, R.K. 2009. Gene-Based Marker Systems in Plants: High Throughput Approaches for Marker Discovery and Genotyping. p. 119–142. *In* Jain, S.M., Brar, D.S. (eds.), *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Springer Netherlands.
- Varshney, R.K., A. Graner, and M.E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23(1): 48 – 55.
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93(1): 77–78.
- Wang, H., R.V. Penmetsa, M. Yuan, L. Gong, Y. Zhao, B. Guo, A. Farmer, B. Rosen, J. Gao, S. Isobe, D. Bertioli, R. Varshney, D. Cook, and G. He. 2012. Development and characterization of BAC-end sequence derived SSRs, and their incorporation into a new higher density genetic map for cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology* 12(1): 10.
- You, F.M., N. Huo, Y.Q. Gu, M.C. Luo, Y. Ma, D. Hane, G.R. Lazo, J. Dvorak, and O.D. Anderson. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics* 9(253).
- Young, N.D. 2000. The genetic architecture of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3(4): 285–290.
- Young, R.A., and J.D. Kelly. 1996. Gene pyramiding using marker assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 39: 57–58.
- Yu, Y.G., G.R. Buss, and M.A. Saghai Maroof. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11751–11756.
- Zhang, L.P., A. Khan, D. Niño-Liu, and M.R. Foolad. 2002. A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon hirsutum* cross. *Genome* 45(1): 133–146.
- Zhang, H., Wang YueJin, Zhang ChaoHong, Wang XiPing, Li Huie, and Xu WeiRong. 2011. Isolation, characterization and expression analysis of resistance gene candidates in pear (*Pyrus* spp.). *Scientia Horticulturae* 127(3): 282–289.

**4. QTL asociados con la
resistencia a *Colletotrichum
lindemuthianum*, en la población
G2333 X G19839**



Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar marcadores moleculares asociados con loci de características cuantitativas (QTL) para resistencia a antracnosis. La antracnosis (causada por *Colletotrichum lindemuthianum*) es una de las principales enfermedades de frijol a nivel mundial, especialmente en la zona Andina de Colombia y países vecinos. Existen marcadores asociados a genes mayores, pero pocos estudios de herencia cuantitativa y multigénica. Para la identificación de QTL se utilizó un mapa saturado con nuevos marcadores tipo RGH-SSR, desarrollado para la población G2333 x G19839, donde G2333 es resistente y G19839 moderadamente resistente (de acuerdo a observaciones realizadas en campo. La evaluación fenotípica se realizó en condiciones de campo e invernadero, utilizando nueve razas diferentes. La evaluación genotípica y fenotípica permitió identificar 21 QTL asociados con resistencia a antracnosis, los cuales explican varianzas fenotípicas entre 9 y 89%. Estos marcadores y su mejor ubicación genómica constituyen una fuente importante de información, para el desarrollo de marcadores funcionales que puedan ser utilizados en selección asistida o para procesos de clonación posicional de genes de interés.

Palabras clave: antracnosis, RGH-SSR, frijol.

Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado como una de las fuentes de proteína vegetal más importantes a nivel mundial, por lo que está incluido dentro de los componentes de seguridad alimentaria. Representa la principal leguminosa comestible en países subdesarrollados, donde el consumo per cápita puede alcanzar los 50 Kg en algunas regiones (Broughton et al., 2003). Para el año 2009, a nivel global se cosechó un área de 25.563.866 ha con una producción de 20.698.984 t, en la que estuvieron involucrados 121 países, en este año Colombia participó con una producción de 153.576 t, correspondiente a solo el 0,74% de la producción mundial (FAO, 2011).

A pesar de que Colombia cuenta con todas las condiciones para el cultivo de frijol, la siembra de esta leguminosa se ha desestimulado, lo que conlleva a que actualmente la producción nacional no sea suficiente para cubrir la demanda interna y se tengan que realizar importaciones (Fenalce, 2010). Dentro de las razones que explican el poco desarrollo de este cultivo, se encuentra la ocurrencia de enfermedades como la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Guzmán et al., 1979; Schwartz et al., 2005). Para su control los agricultores utilizan una gran cantidad de fungicidas, lo que incrementa los costos de producción y por lo tanto disminuye su rentabilidad. El uso de fungicidas también incrementa el impacto ambiental desfavorable por contaminación en el grano para consumo, contaminación de suelo y agua y puede causar toxicidad al personal que hace las aplicaciones de manera frecuente.

C. lindemuthianum es un hongo Deuteromycete, haploide, uninucleado y hemi-biótrofo (Bryson et al., 1992). Los principales síntomas de la enfermedad son manchas de color café oscuro en el envés de las hojas y cuando la infección es más fuerte llega a afectar el tallo, donde las manchas son más hundidas. También causa lesiones en las vainas, que por lo general son manchas circulares y profundas de color café, las cuales llegan posteriormente a infectar el grano (Schwartz et al., 2005). En una variedad susceptible, la planta puede ser atacada desde la siembra hasta la cosecha. Además de la reducción del rendimiento, las lesiones en las vainas y en los granos perjudican su calidad y por consiguiente su comercialización. Cuando la infección ocurre a partir de semilla infectada, bajo condiciones favorables y si no se realiza un control adecuado la

enfermedad ocasiona pérdidas entre un 45% a un 100% (Guzmán et al., 1979^a). El uso de variedades resistentes es considerado el mejor método de control para antracnosis en frijol (del Peloso et al., 1989; Beebe and Corrales, 1991; Castanheira et al., 1999). Esta forma de manejo se considera la mejor alternativa gracias a su fácil adopción por parte de los agricultores y al bajo costo, siendo también ecológicamente segura ya que disminuye o evita el uso indiscriminado de agroquímicos (Silva y Santos, 2001).

En la resistencia genética a antracnosis es importante trabajar bajo el concepto de co-evolución, pues es un proceso que se ha identificado en la interacción *Phaseolus vulgaris*- *C. lindemuthianum* (Geffroy et al., 1999). En frijol los análisis genéticos basados en marcadores neutrales, dan evidencia de dos procesos de domesticación independientes que dieron origen al acervo genético Andino y Mesoamericano (Gepts y Debouck, 1991; Gepts, 1998). Estos dos acervos se separaron a partir de un ancestro común hace <0.6 millones de años (Chacón et al., 2007). En el caso de aislamientos de *C. lindemuthianum* provenientes de Mesoamérica se ha identificado una mayor patogenicidad hacia genotipos Mesoamericanos y así mismo los genotipos Andinos por lo general son más patogénicos en genotipos de este acervo genético (Geffroy et al., 1999). En los programas de mejoramiento y patología de la región Andina, por lo tanto se trata de identificar y trabajar con genotipos provenientes del acervo Mesoamericano que son los que confieren el mayor espectro de resistencia hacia los genotipos andinos del hongo.

Para la resistencia genética en frijol hacia *C. lindemuthianum* se han reportado trece genes, codificados desde el *Co-1* al *Co-13*. Los genes *Co-1*, *Co-12* y *Co-13* han sido identificados en genotipos andinos y los restantes en genotipos del acervo mesoamericano (Young y Kelly, 1996; Singh y Schwartz, 2010). Los genes *Co-7* y *Co-9* (ahora codificado como *Co-3³*) se han descrito como formas alélicas del gen *Co-3* (Singh y Schwartz, 2010). La localización de nueve de estos genes en el mapa genético, se ha definido por análisis de ligamiento. De tal manera que en el grupo de ligamiento b01 se localiza el *Co-1*, en el grupo de ligamiento b04 se ubican los genes *Co-3/Co-7/Co-9* (o *Co-3³*) y *Co-10*, los genes *Co-5* y *Co-6* se encuentran ubicados en el grupo de ligamiento b07, el gen *Co-4* está localizado en el grupo de ligamiento b08 y finalmente, en el grupo de ligamiento b11 se ubica el gen *Co-2* (Kelly y Vallejo, 2004).

Adicional a la identificación de los genes que confieren resistencia a cierto patógeno, en el desarrollo de variedades mejoradas la identificación de las razas y estructura poblacional del patógeno es fundamental. En frijol existe una serie diferencial de 12 cultivares provenientes del acervo andino o mesoamericano correspondientes a los genotipos: Michelite, MDRK, Perry Marrow, Cornell 49242, Widusa, Kaboon, Mexico 222, PI 207262, TO, TU, AB136 y G2333. La clasificación de un patotipo se da por la suma de los valores numéricos (o número binario) de cada cultivar diferencial susceptible para ese patotipo. La adopción y uso de los cultivares diferenciales, ha permitido la comparación de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación y una completa caracterización de la gran variabilidad existente en *C. lindemuthianum* (Melotto et al., 2000; Kelly y Vallejo, 2004). Este sistema ha sido ampliamente utilizado tanto en programas de fitomejoramiento como fitopatología.

Dentro de los cultivares diferenciales, se destaca el genotipo G2333 que ha mostrado ser resistente a razas de *C. lindemuthianum* en diversos países incluyendo Argentina, Brasil, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, México y África (Pastor-Corrales et al., 1994). Según Mahuku et al. (2002), el cultivar G2333 es resistente a más del 90% de las razas que han sido descritas, aunque es susceptible a las razas 3481, 3545, 3977 y 3933 de Costa Rica, México y Argentina. Riascos (2001), encontró que este cultivar solo fue compatible con las razas 3481, 3545, 3877 y 3993. Pastor-Corrales et al. (1994), lograron determinar que la resistencia en G2333 es controlada por dos genes dominantes independientes denominados *Co-4* y *Co-7*. Balardin et al. 1997, denominaron a uno de los genes de G2333 como *Co-4²*, diferenciando este alelo debido a su amplio espectro de resistencia, que le brindaba al frijol incompatibilidad en la interacción con 33 de las 34 razas de *C. lindemuthianum* colectadas en diferentes países de América Latina. Posteriormente, Young y Kelly (1996), mostraron que este cultivar también porta el gen *Co-5*, el cual no fue observado por Pastor-Corrales et al. (1994), porque utilizaron la raza 521, patogénica frente a este gen. Vallejo y Kelly, (2009), mediante pruebas de alelismo propusieron que el gen presente en este genotipo correspondía a *Co-5²*, para diferenciarlo del gen *Co-5* presente en el cultivar diferencial TU, porque presenta otro espectro de resistencia. Estos mismos autores mediante la segregación obtenida en las pruebas de alelismo propusieron la presencia de un cuarto gen en G2333, aunque no se han realizado nuevas pruebas para validar esta propuesta.

Teniendo en cuenta que G2333 ha sido resistente a todas las razas de *C. lindemuthianum* identificadas en Colombia (Riascos, 2001; Rincon, 2007), este genotipo se utilizó como fuente de resistencia a antracnosis en el proyecto de mejoramiento de leguminosas de la Universidad Nacional sede Bogotá. Este proyecto está dirigido a la obtención de nuevas variedades de frijol común con resistencia a enfermedades, entre otras características de interés. De esta manera se realizaron cruzamientos entre variedades cultivadas en Boyacá y Cundinamarca como el frijol tipo “Bola Roja” y “Cargamanto” con G2333. Dentro de la ejecución del proyecto, se utilizaron técnicas de mejoramiento convencional, como los procesos de hibridación y selección. Así mismo, se implementó selección asistida con marcadores moleculares (SAM), mediante el uso de los marcadores tipo SCAR (sequence characterized amplified regions) SAB3 ligado a 12,9 cM del gen de resistencia Co-5 y SAS13 que hace parte del locus Co-4 (Garzón et al., 2008).

La eficiencia en la selección fué del 69% al utilizar el SAB3, 50% con el SAS13 y al utilizar los datos de SAB3 y SAS13, es decir seleccionando como resistentes las plantas que amplificaban ambos marcadores, se obtuvo un 82% de eficiencia en el proceso de selección asistida (Garzón et al., 2008). Esto evidenció la necesidad de identificar marcadores con una menor distancia en centimorgan con respecto al gen Co-5 (puesto que se presentaron falsos positivos y falsos negativos, es decir plantas que amplificaron el marcador fueron susceptibles y viceversa) y también identificar nuevos marcadores asociados con otras regiones involucradas en la resistencia a antracnosis.

Puesto que la mayoría de las características de importancia agronómica, son heredadas de manera cuantitativa, se decidió utilizar el mapeo de loci de características cuantitativas (QTL) como estrategia para la identificación de nuevos marcadores asociados con regiones de resistencia de interés (Tanksley, 1993). Las estrategias de mapeo de QTL consisten en la combinación de la información molecular (marcadores) con la información fenotípica (cuantitativa) usando modelos estadísticos. Se trata de detectar una asociación entre la variación observada a nivel fenotípico y la variación a nivel molecular. El éxito depende de la calidad de la información (molecular y fenotípica) y de los métodos estadísticos utilizados (Tanksley, 1993).

El mapeo de QTL en plantas es una metodología propuesta para estudiar la resistencia con una base genéticamente compleja (Kearsey y Farquhar, 1998). El estudio de QTL en diferentes especies ha permitido establecer el número de loci involucrados en resistencia cuantitativa, interacciones epistáticas y ambientales, loci de resistencia parcial o específica y la relación entre loci cuantitativos y cualitativos (Tanksley, 1993; Collard et al., 2005). Adicionalmente, el mapeo de QTL da una base para la selección asistida por marcadores de caracteres complejos de resistencia a enfermedades y la clonación posicional de genes de resistencia parcial (Young, 1996).

La primera aproximación para determinar QTL asociados con resistencia a antracnosis en frijol, fue realizada por Geffroy et al. (2000), con la población BAT93 x JaloEEP558 (moderadamente resistente x susceptible) y lograron ubicar doce QTL asociados con resistencia frente a las razas denominadas 45 y A7, donde la varianza fenotípica explicada por componentes genéticos varió de 11 a 76%. Estos autores realizaron la evaluación fenotípica y genotípica en tallo, hoja y pecíolo y los resultados les permitieron concluir que los genes responsables de la resistencia contra las dos cepas utilizadas eran distintos, pero las reacciones contra la misma cepa en diferentes órganos era condicionada por los mismos genes.

Posteriormente, López et al., (2003) a partir de primers diseñados del dominio de unión a nucleótidos (NBS) y del dominio Toll y Interleukin-1 Receptor (TIR), obtuvieron cinco análogos de genes de resistencia (RGAs) que mapearon en regiones genómicas, con QTL asociados a resistencia frente a los aislamientos 5DOM, 235COL, 289COL, 20COL, 43COL y 77CRI de *C. lindemuthianum*, con varianzas que explicaban del 12 al 41.4 % de la resistencia. Dos fragmentos polimórficos del RGA1 estuvieron a un intervalo de 9 cM y explicaron el 41.4% y 23.2% de la resistencia frente al aislamiento 43COL. El RGA2a que presentó un R^2 de 0.15 frente al aislamiento 5DOM, se localizó en el grupo de ligamiento b04 en la misma región de los RGAs PRLB y PRLJ previamente reportados por Geffroy et al., (1999) y el RGA2b cosegregó con el RGA1a en el grupo de ligamiento b11. El RGA 7 estuvo asociado con la resistencia a los aislamientos de *C. lindemuthianum* 43COL ($R^2=0.242$) y 5DOM ($R^2= 0.12$) y se ubicó en el grupo de ligamiento b10 (López et al., 2003).

En el presente estudio para la identificación de regiones genómicas asociadas con resistencia a antracnosis, se decidió utilizar la población G2333 x G19839, dado que es la única que involucra como parental al genotipo G2333 que como se mencionó anteriormente se seleccionó como fuente de resistencia a antracnosis, para el programa de mejoramiento de variedades comerciales colombianas. Además en estudios previos de QTL no se han utilizado genotipos diferenciales, ni variedades volubles (Geffroy et al., 2000; López et al., 2003).

En este contexto el objetivo principal del trabajo fue la identificación de regiones genómicas asociadas con resistencia a antracnosis, especialmente para el grupo de ligamiento b07 donde se localiza el gen Co-5 derivado del genotipo G2333. Para lograr este fin, se buscaron asociaciones entre la resistencia y los marcadores RGH-SSR desarrollados en el capítulo anterior. Adicionalmente, se quiso establecer si G19839 aporta genes de resistencia como parental Andino y si estos difieren de los genes andinos ya reconocidos. Este trabajo está enfocado al uso de los resultados en programas de mejoramiento y fitopatología dirigidos a la obtención de variedades colombianas, dado que actualmente el grupo de la Universidad Nacional de Colombia-Bogotá es el único que está realizando mejoramiento de frijoles volubles para la obtención de nuevas variedades, que respondan a las necesidades de las principales zonas productoras en nuestro país.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Material vegetal y mapa genético

Para la identificación de marcadores asociados a genes de resistencia, se utilizó la población de líneas endogámicas recombinantes (RILs), derivada del cruce entre el genotipo G2333 y el genotipo G19839.

El cultivar G2333 (Colorado de Teopsica) pertenece al acervo Mesoamericano y a la raza Mesoamérica, fue colectado en Chiapas, México. Tiene una semilla de color rojo, pequeña (peso de 100 semillas <25 g), con hábito de crecimiento indeterminado tipo IV (Pastor-Corrales et al., 1994). El cultivar G19839 pertenece al acervo Andino y a la raza Perú, fue colectado en Chachapoyas, Perú. Presenta semillas de color negro-amarilla,

grande (peso de 100 semillas > 40 g), y las plantas tienen hábito de crecimiento IV postrado-indeterminado (Singh et al., 1991) (Figura 4-1.). Se ha observado que este cultivar presenta cierto grado de resistencia, presumiblemente debido a genes de resistencia menores (comn. personal con M. Blair).

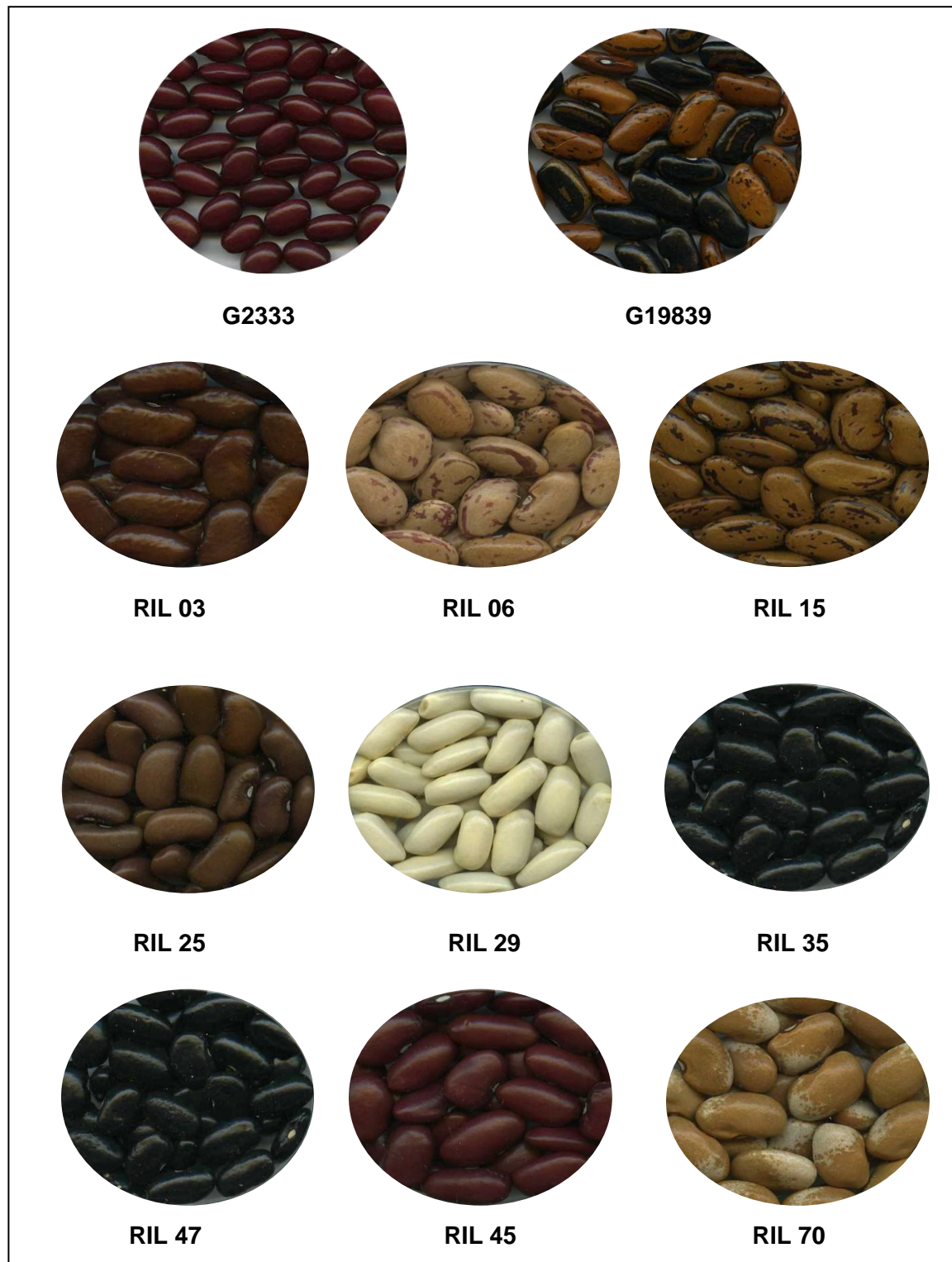
El Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, desarrolló la población RIL que actualmente tiene 84 líneas F4:8 utilizando la metodología de descendencia por semilla única (SSD, por sus siglas en ingles) a partir del cruce entre G2333 x G19839. El fenotipo de semilla de G2333, G19839 y algunas líneas RIL se presenta en la Figura 4-1.

Para complementar el mapa pre-establecido por Ochoa et al. (2006) y Checa y Blair, (2008) se consideró una matriz ampliada de datos genotípicos que incluye los generados en el Capítulo 2. Brevemente, se evaluaron primers degenerados diseñados a partir del dominio NBS de genes de resistencia y RGH de *Medicago truncatula*, especie modelo para estudios en leguminosas. De esta manera se identificaron secuencias que codificaban tanto para proteínas de resistencia TIR como no-TIR, a partir de las cuales se identificaron clados y se diseñaron sondas que fueron evaluadas en la librería BAC de G19839. En las secuencias BAC-end de los clones positivos se identificaron marcadores microsatélite putativamente asociados a las secuencias de RGHs. Estos marcadores fueron evaluados en los parentales G2333 y G19839, los marcadores polimórficos se evaluaron en la población RIL derivada de estos genotipos. Así, se saturó el mapa con 155 nuevos marcadores, para un total de 298 marcadores mapeados.

4.1.2 Evaluación fenotípica en condiciones de invernadero

Se realizó una evaluación inicial en invernadero con el propósito de identificar las razas de *Colletotrichum lindemuthianum*, que causaban una respuesta contrastante en G2333 y G19839 al ser inoculados con diferentes aislamientos. Los aislamientos evaluados hacen parte de la colección de *C. lindemuthianum* del laboratorio de fitopatología del CIAT.

Figura 4- 1. Fenotipo de semillas de los parentales G23333 y G19839 y de algunas líneas RIL derivadas del cruce entre estos genotipos.



Los aislamientos con una respuesta de resistencia contrastante entre G2333 y G19839 se seleccionaron y evaluaron en las 84 líneas RIL, incluyendo además los parentales y el set de doce cultivares diferenciales. Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en los invernaderos del laboratorio de Fitopatología de frijol del CIAT-Palmira.

En bandejas de germinación se sembraron 10 semillas de cada uno de los genotipos a evaluar. Las plántulas se inocularon 8 días después de emergencia, cuando las hojas cotiledonares estaban completamente expandidas, utilizando una concentración de 1.2×10^6 conidias/ml, mediante un aspersor De Velbiss. Las plántulas se mantuvieron en condiciones controladas (22°C, HR 100%), para favorecer el desarrollo de la enfermedad.

La evaluación se llevó a cabo mediante la escala 1-9 propuesta por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987), en la cual plantas con valores de 1 a 3 son consideradas resistentes (R), de 4 a 6 presentan resistencia intermedia (I) y de 7 a 9 son consideradas susceptibles (S). Cada plántula se contó como unidad experimental, y el promedio de las 10 evaluaciones se utilizó para realizar los análisis respectivos.

4.1.3 Evaluación fenotípica en condiciones de campo

La población RIL y los parentales G2333 y G19839, se evaluaron por su reacción en el campo hacia *C. lindemuthianum* en dos localidades. La primera en el centro experimental de la fundación educativa superior (FES), ubicado en Popayán - Cauca, con 1.737 msnm; una temperatura promedio de 19.8 °C y una precipitación anual de 1.941 mm. La segunda evaluación se realizó en la estación experimental agrícola de la Corporación de Investigación Colombiana Agropecuaria (Corpoica), localizada en Río Negro - Antioquia, con 2.200 msnm, una temperatura promedio de 16,7 °C, con humedad relativa de 78% y una precipitación anual de 1.937 mm. Estas dos localidades cuentan con las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la antracnosis. La evaluación en Popayán se realizó en el segundo semestre del 2009 y la evaluación en Río Negro en el segundo semestre del 2010.

Se evaluaron 90 tratamientos correspondientes a: 84 líneas RIL, los parentales G2333 y G19839 y como controles el genotipo G19833, las líneas SEL1360 y SEL1308 y la variedad local Agrario. Se utilizó un diseño lattice desbalanceado 9x10 con bloques y

columnas y 3 repeticiones. En cada parcela de 2m se sembraron 20 semillas, espaciadas a 10 cm. La distancia entre surcos fue de 1m y entre calles 0.5 m. Como esparcidores se utilizó una mezcla de frijol tipo Bola Roja, Cargamanto y habichuela “Lago Azul”, debido a que estas variedades son altamente susceptibles a antracnosis. Los esparcidores se colocaron cada dos bloques, en parcelas de 1 m y adicionalmente el lote se rodeó con este mismo material para evitar el efecto de borde. El manejo agronómico se realizó de acuerdo a los estándares utilizados en cada región, excepto por el control de enfermedades para lo cual no se realizó aplicación de fungicidas.

A pesar de que ambas localidades se caracterizan por presentar una alta presión del patógeno, se realizaron inoculaciones artificiales, utilizando aislamientos de *C. lindemuthianum* previamente identificados en cada localidad. La inoculación se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987),, utilizando una concentración de 1.2×10^6 conidias/ml. La aplicación se realizó con una bomba de espalda con motor.

4.1.4 Variables evaluadas en campo

Se realizaron evaluaciones en hoja y vaina durante diferentes etapas de desarrollo y crecimiento del cultivo, para determinar el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE o AUDPC por sus siglas en ingles), mediante la fórmula:

$$Y = \sum \left[\frac{(X_i + X_{i+1})}{2} \right] (t_{i+1} - t_i)$$

donde Y es el valor de ABCPE, X_i es el valor de antracnosis para la evaluación i , X_{i+1} es el valor de antracnosis en la evaluación $i+1$ y $(t_{i+1}-t_i)$ es el número de días transcurridos entre dos evaluaciones (Campbell y Madden, 1990).

Dentro de las variables evaluadas en hoja, se determinó la severidad de la infección en cada parcela teniendo en cuenta la escala propuesta por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987), y la incidencia se determinó contando el número de plantas infectadas sobre el número total de plantas en cada parcela, dada en porcentaje.

En vaina, se evaluaron algunos componentes de resistencia adicionales como severidad, para lo cual se dio un valor general a la parcela, de acuerdo a la escala de evaluación de antracnosis en vaina propuesta por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987),. La incidencia se evaluó seleccionando una planta de cada parcela neta experimental y la parte media de la planta se marcó con una cinta en cada extremo, en esta área se determinó el número de vainas infectadas con antracnosis sobre el número total de vainas y el valor se dio en porcentaje de vainas afectadas respecto al total de vainas evaluadas. Finalmente se determinó el número de lesiones, para lo cual de la planta seleccionada se marcó una vaina para hacer el conteo y seguimiento de esta variable.

4.1.5 Análisis de datos e identificación de QTL

A los datos de campo se les realizó la prueba de homogeneidad de varianza, que se determinó mediante la prueba de Levene. A los datos que no presentaron una distribución normal se les realizó una transformación logarítmica ($x+1$). Con los valores transformados, se realizaron los respectivos análisis de varianza y de esta manera se obtuvo el valor medio para cada variable. Para estos análisis se utilizaron las pruebas incluidas dentro del paquete estadístico SAS 9.2 (SAS, 2010).

En el caso de las evaluaciones fenotípicas realizadas en invernadero y teniendo en cuenta que para el estudio de QTL se requieren valores cuantitativos, el análisis de QTLs se realizó de manera independiente con los siguientes datos:

El valor promedio de severidad obtenido para las diez evaluaciones utilizando la escala 1-9.

El valor promedio de severidad obtenido para las diez evaluaciones utilizando la escala 1-9 transformado con logaritmo ($x+1$).

El valor promedio de severidad obtenido para las diez evaluaciones utilizando la escala 1-9, se expresó en porcentaje de área foliar afectada (AFA), en base a las correspondencias de severidad descritas por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987) que van de 0 a 25%. (Tabla 4-1).

Teniendo en cuenta que con los valores de la escala anterior, no es posible diferenciar por ejemplo una planta con un 25% de AFA de una con un 50% de AFA, se diseñó una escala con valores de severidad de 0 a 100% (Tabla 4-1).

La aplicación y ventajas/desventajas de estos valores se discute más adelante.

Tabla 4- 1. Escala de evaluación con su correspondencia en porcentaje de área foliar afectada (AFA) y severidad de 0-100%.

Escala 1-9	Área foliar afectada* 0-25	Severidad 0-100**
1	0 .0	0 .0
2	0 .5	0 .4
3	1 .0	1 .3
4	3 .0	5 .3
5	5.0	11 .1
6	7 .5	20 .0
7	10.0	31 .1
8	17 .5	62 .2
9	25	100 .0

* Valores dados por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987)

**Valores de severidad, estimados a partir de la escala de evaluación 1-9.

Las evaluaciones fenotípicas se adicionaron al mapa de ligamiento de G2333 x G19839 desarrollado por Garzón et al., (submitted), utilizando el programa MapDist v. 1.7 beta (Lorieux, 2012). Los QTL para características de resistencia se identificaron con mapeo de intervalo utilizando el programa WinQTL Cartographer versión 2.5 (Zhang et al., 2011). Los valores LOD se determinaron por medio de 1.000 permutaciones con un valor de significancia del 5%.

Adicionalmente se realizó mapeo de intervalo compuesto (MIC) por cromosoma. Se utilizó un tamaño de ventana de 10 cM para todo el análisis, velocidad de caminado de 1cM y probabilidad de rechazo de asociación a nivel de 0.05. Se utilizaron regresiones lineales múltiples (forward y backward) para cada punto del cromosoma a 1 cM de distancia entre ellos. La probabilidad de la presencia de un QTL se expresó como LOD y el umbral o valor por encima del cual se consideró un supuesto QTL como significativo,

se fijó de acuerdo al resultado de 1000 permutaciones, a un nivel de significancia del 5% para cada característica. La posición del QTL correspondió a la región que superó el umbral o punto del LOD máximo del segmento bajo consideración. La varianza fenotípica explicada por cada QTL, se estimó mediante el coeficiente de regresión (R^2).

El programa Map chart (Voorrips, 2002) se utilizó para visualizar el mapa genético y localizar los QTL identificados en el grupo de ligamiento correspondiente.

Para identificar la interacción entre tres loci se utilizó el programa “Genotyping Matriz Mapping-GMM” (Isobe et al., 2007),

4.2 Resultados

4.2.1 Evaluación fenotípica en condiciones de invernadero

Las pruebas de patogenicidad preliminares bajo condiciones de invernadero, permitieron establecer las razas patogénicas en G19839 y no patogénicas en G2333 e identificar los aislamientos útiles para realizar las evaluaciones en invernadero y campo utilizando toda la población RIL G2333 x G19839.

La Tabla 4-2 muestra la respuesta de los doce cultivares diferenciales al ser evaluados con diecisiete aislamientos de *C. lindemuthianum*. La raza se definió siguiendo el esquema propuesto por CIAT (1987), sumando los números binarios de los cultivares que presentaron una reacción compatible al ser infectados con *C. lindemuthianum*. Adicionalmente se discrimina el o los genes que se han identificado en cada cultivar (Kelly y Vallejo, 2004; Vallejo y Kelly, 2009). El cultivar diferencial Michelite fue susceptible a todas las razas evaluadas, por lo que el gen *Co-11*, no se puede considerar como una fuente útil para programas de mejoramiento de frijol Andino. Los genes *Co-2* y *Co-5* presentes en los cultivares Cornell 49242 y TU respectivamente, sólo fueron resistentes a el 53% de los aislamientos evaluados, por lo que tampoco podrían usarse como parentales dentro de un programa de mejoramiento para resistencia a antracnosis.

Los cultivares diferenciales MDRK (genes *Co-1* y *Co-3*), Perry Marrow (genes *Co-13* , *Co-1³*) y PI207262 (genes (*Co-4³* y *Co-3³*) fueron resistentes en promedio a 11 razas, a pesar de tener un buen nivel de resistencia, sería arriesgado utilizarlos en programas de

mejoramiento, sin tener un estudio detallado de las razas presentes en cada departamento o localidad. Solamente en la interacción con una raza se observó una respuesta de susceptibilidad al evaluar los diferenciales Kaboon (raza Co-1²) , Mexico 222 (Co-3) y TO (Co-4). G2333 y Widusa fueron los únicos genotipos que presentaron una reacción de resistencia con todas las razas evaluadas. El gen Co-1 se ha descrito como una fuente de resistencia importante para programas de mejoramiento de frijol mesoamericano, aunque su utilidad aún no se ha registrado en programas andinos.

En la Tabla 4-3 se discriminan los diecisiete aislamientos evaluados y la raza correspondiente. Se presenta el grado de severidad obtenido para G2333 y G19839, se discrimina si este valor corresponde a un genotipo resistente, con resistencia intermedia o susceptible y se describe si se utilizó este aislamiento para evaluar la población RIL. G2333 fue resistente a los diecisiete aislamientos evaluados.

Los aislamientos correspondientes a las razas 3, 7, 79, 133, 519, 523 y 525 que fueron patogénicos en G19839 se evaluaron en toda la población RIL G2333 x G19839. Tres de estos aislamientos causaron enfermedad con valores superiores a 7 (razas 3, 133 y 523) por lo que G19839 se consideró susceptible, y otros cuatro aislamientos causaron una respuesta de resistencia intermedia (razas 7, 79, 519 y 525) (Tabla 4.3). Adicionalmente, se evaluaron los aislamientos CI-227 y CI-389, que no infectaron G19839 y tampoco fueron patogénicos frente a G2333, con el propósito de observar el comportamiento de la progenie y la presencia de posibles segregantes transgresivos.

Tabla 4- 2. Evaluación de diecisiete aislamientos de *C. lindemuthianum* en cultivares diferenciales e identificación de razas.

Número binario	Gen de resistencia	Cultivar diferencial zknmmnsd kkkkk Aislamiento	525	39	56	432	02	212	303	389	227	411	17	20	100	305	89	9
1	Co-11	Michelite	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
2	Co-1, Co-3	MDRK	*	*	*		*	*			*	*						
4	Co-13, Co-1 ³	Perry Marrow		*	*	*	*		*							*		
8	Co-2	Cornell 49242			*				*		*	*		*	*	*	*	
16	Co-1 ⁵ , Co-3	Widusa																
32	Co-1 ²	Kaboon						*										
64	Co-3	Mexico 222			*													
128	Co-4 ³ , Co-3 ³	PI 207262				*				*	*	*						
256	Co-4	TO										*						
512	Co-5	TU					*	*	*		*		*	*	*	*		
1024	Co-6, co-8	AB 136															*	
2048	Co-4 ² , Co-5 ² , Co-7	G2333																
		Raza	3	7	79	133	519	523	525	129	651	395	513	521	521	525	1033	11

Tabla 4-3. Aislamientos de *Colletotrichum lindemuthianum* (CI) evaluados bajo condiciones de invernadero en los genotipos G19839 y G2333* y la población RILs derivada de la cruce entre estos parentales.

Raza	Aislamiento	Patogenicidad en G19839		Evaluación en RILs
		Escala 1-9	R/I/S**	
3	CI-525	9.0	S	SI
7	CI-39	3.8	I	SI
79	CI-56	5.9	I	SI
133	CI-432	9.0	S	SI
519	CI-02	3.1	I	SI
523	CI-212	7.9	S	SI
525	CI-303	3.5	I	SI
129	CI-389	1.1	R	SI
651	CI-227	1.1	R	SI
395	CI-411	1.0	R	NO
513	CI-17	1.0	R	NO
521	CI-20	1.0	R	NO
521	CI-100	1.0	R	NO
525	CI-305	1.0	R	NO
1033	CI-89	1.1	R	NO
1153	CI-94	1.0	R	NO
1545	CI-25	1.0	R	NO

*G2333 fue resistente a todos los aislamientos evaluados, mientras que G19839 fue variable en su respuesta.

** R/I/S: Resistente, Resistente intermedio, Susceptible.

La respuesta de resistencia de las 84 líneas RILs inoculadas en ensayos independientes con las nueve razas de *C. lindemuthianum* en condiciones de invernadero se resume en la Tabla 4-4. Se presenta el valor de severidad correspondiente según la evaluación en la escala 1-9 que se observó en G2333 y G19839; para el caso de las líneas endogámicas recombinantes se presenta un resumen del número total de líneas con cada fenotipo (resistencia, resistencia intermedia, susceptibilidad). Los aislamientos CI-389 (raza 129) y CI-227 (raza 651) que no fueron patogénicos en los parentales G2333 y G19839, presentaron segregación transgresiva en la progenie, observándose algunas líneas susceptibles a la infección con *C. lindemuthianum*. Para los demás aislamientos evaluados se observaron tanto líneas resistentes, como líneas con resistencia intermedia o susceptibilidad. La Figura 4-2, muestra el histograma obtenido para cada una de las evaluaciones en invernadero, donde se observa que no se presentó una distribución

normal de los datos, puesto que prevalecieron los fenotipos asociados con resistencia y resistencia intermedia

Figura 4- 2. Histogramas de frecuencia de la evaluación fenotípica de resistencia/susceptibilidad con nueve razas de *C. lindemuthianum* en la población RIL G2333 X G19839 en condiciones de invernadero.

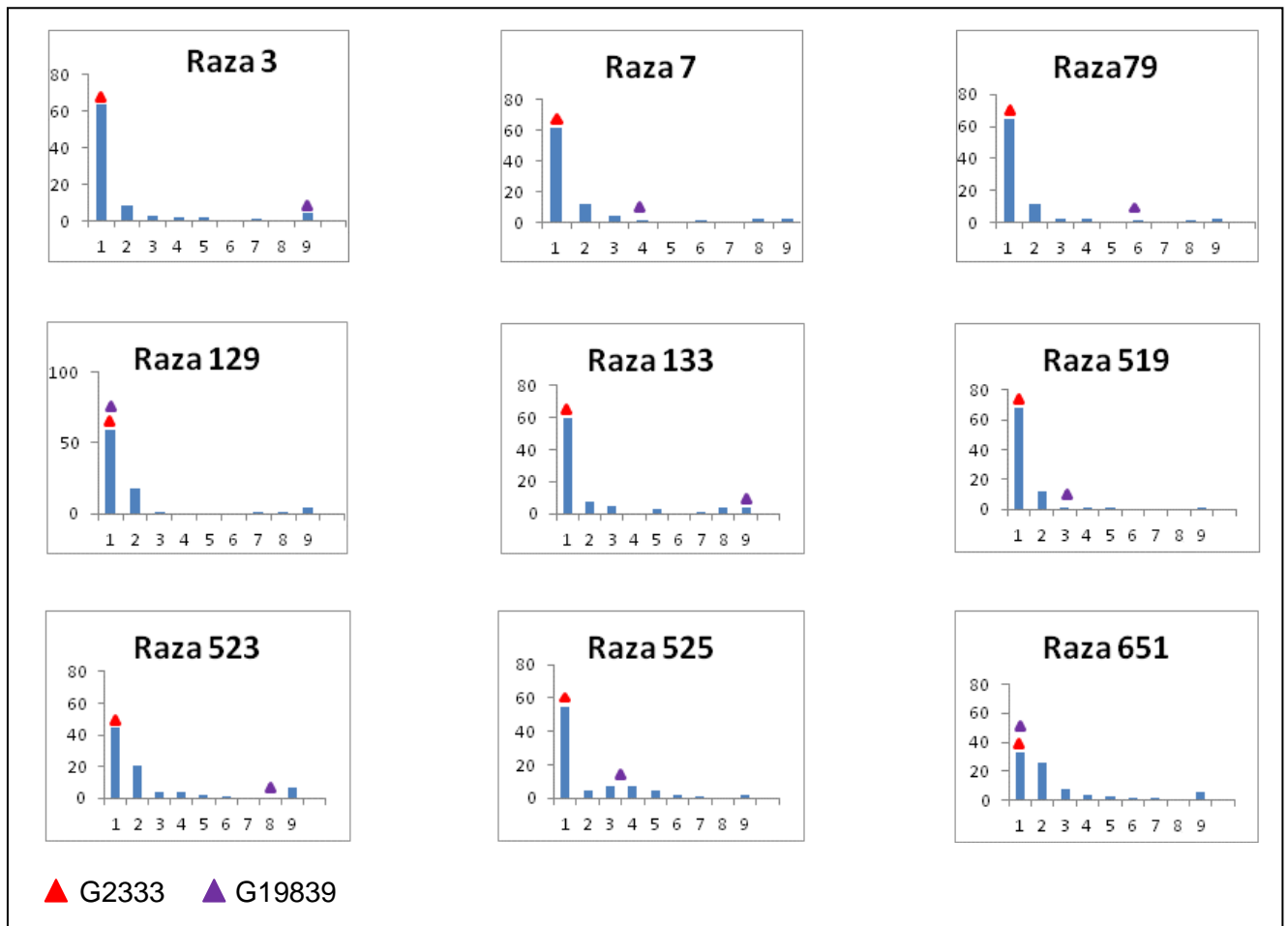


Tabla 4- 4. Resumen de evaluación de siete aislamientos de *C. lindemuthianum* en la población RIL G2333 x G19839 y sus parentales.

Respuesta de resistencia	Raza 3	Raza 7	Raza 79	Raza 129	Raza 133	Raza 519	Raza 523	Raza 525
G2333	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
G19839	9,0	3,8	5,9	1,1	9,0	3,1	7,9	3,5
RILs								
Resistente	75	78	77	78	71	81	70	67
Intermedio	6	4	3	0	0	2	13	0
Susceptible	3	2	4	6	13	1	1	17
Total	84	84	84	84	84	84	84	84

4.2.2 Evaluación fenotípica en condiciones de campo

Ninguno de los aislamientos de *C. lindemuthianum* evaluados en invernadero y con una respuesta contrastante de resistencia/susceptibilidad en los parentales G2333 y G19839, se había identificado previamente tanto en Popayán como en Antioquia. Por tal razón los aislamientos inoculados en ambas localidades fueron diferentes. Se utilizó el aislamiento 212 correspondiente a la raza 523 para la evaluación en Popayán y el aislamiento 303 correspondiente a la raza 525 para la evaluación en Antioquia. Estos aislamientos cumplieron con los siguientes criterios: fueron identificados anteriormente en la respectiva localidad, los parentales G2333 y G19839 presentaron una respuesta de resistencia diferente en las pruebas de invernadero, y tuvieron una buena esporulación que permitió obtener grandes cantidades de inóculo para las evaluaciones en campo.

A diferencia de las inoculaciones en invernadero, en los dos ensayos en campo las inoculaciones se realizaron casi un mes después de la siembra (dds). Esto con el fin de brindar a la planta un periodo de adaptación antes de someterla a la infección con *C. lindemuthianum*. Teniendo en cuenta el tiempo de infección y latencia, después de cada inoculación aproximadamente cada ocho días se realizó una evaluación. Debido a que en campo se puede tener inóculo natural, las evaluaciones iniciaron el día de la inoculación.

En Popayán la inoculación se realizó a los 30 días después de la siembra (dds) y adicionalmente se hicieron dos inoculaciones a los 44 y 75 dds (Tabla 4-5). Considerando el clima y la pluviosidad en Popayán en el momento de la siembra se presentaron las condiciones óptimas para el crecimiento del cultivo y para el establecimiento de la infección por parte de *C. lindemuthianum*. Sin embargo, desde el final de la etapa V4 se presentaron condiciones de poca lluvia, que se prolongaron hasta etapas reproductivas avanzadas. Esto influyó en que el establecimiento y desarrollo de la infección no se diera en los niveles esperados. En esta localidad la severidad en hoja se evaluó el día de la inoculación y posteriormente a los 8, 14, 21, 29, 35 y 45 días después de la inoculación (ddi), para un total de siete evaluaciones, que permitieron determinar el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE o AUDPC) para esta variable. La incidencia en cada una de las parcelas se evaluó a los 45 ddi. Las variables severidad, incidencia y número de lesiones en vaina, se evaluaron a los 50 y 56 ddi. La Figura 4-3 muestra la sintomatología de antracnosis en hoja y vaina.

Tabla 4- 5. Resumen de los días en los que se realizaron las inoculaciones y/o evaluaciones con la raza 523 en la población RIL G2333 x G19839 en Popayán.

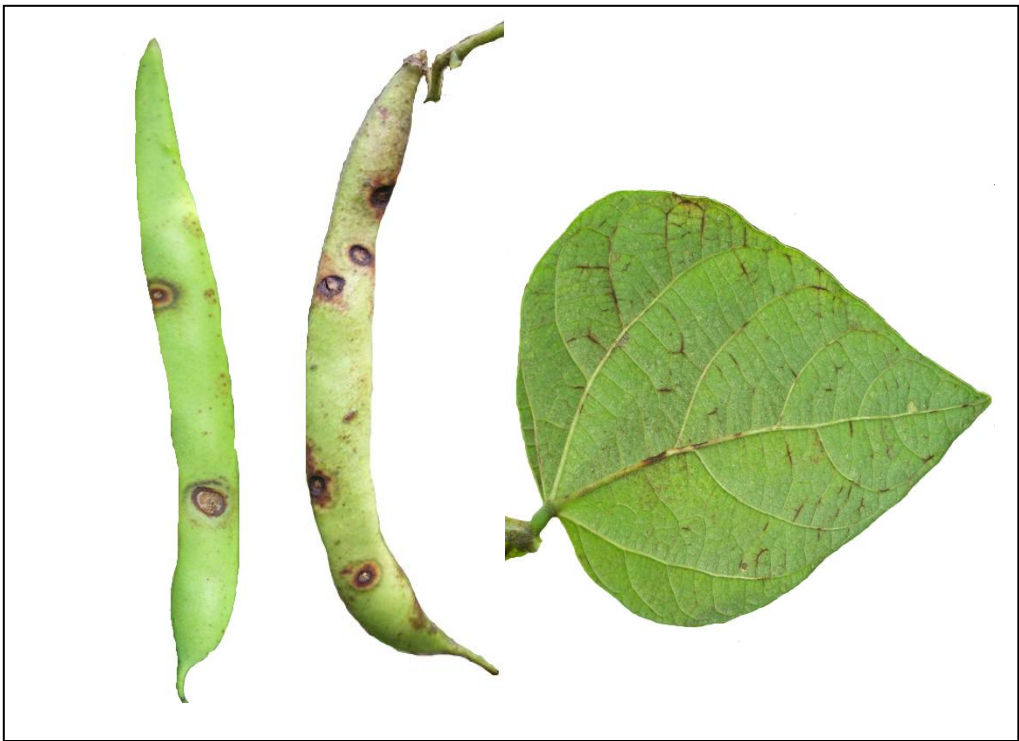
Evaluación en Popayán									
Días después de la siembra (dds)	30	38	44	51	59	65	75	80	86
Días después de la inoculación (ddi)	0	8	14	21	29	35	45	50	56
Inoculación									
Evaluación de severidad en hoja									
Evaluación de incidencia (planta)									
Evaluación de severidad vaina									

En el ensayo realizado en Antioquía, la primera inoculación se realizó a los cuarenta días después de la siembra. Posteriormente se hicieron otras dos inoculaciones a los 64 y 77 dds (Tabla 4.6). Si bien los cultivos de frijol de esta zona presentan graves limitaciones por la presencia de antracnosis, en las evaluaciones del ensayo en campo donde se aumentó la presión de inóculo y las condiciones ambientales fueron las ideales para el desarrollo de *C. lindemuthianum* (lluvias frecuentes lo que garantizó una humedad relativa alta), no se obtuvieron altos niveles de la enfermedad. Esto quizá se debió a que el cultivo presentó síntomas severos causados por ascochyta (*Phoma exigua* var. *diversispora*), que es considerada otra enfermedad limitante en el cultivo de frijol.

Tabla 4- 6. Resumen de los días en los que se realizaron las inoculaciones y/o evaluaciones con la raza 525 en la población RIL G2333 x G19839 en Antioquia.

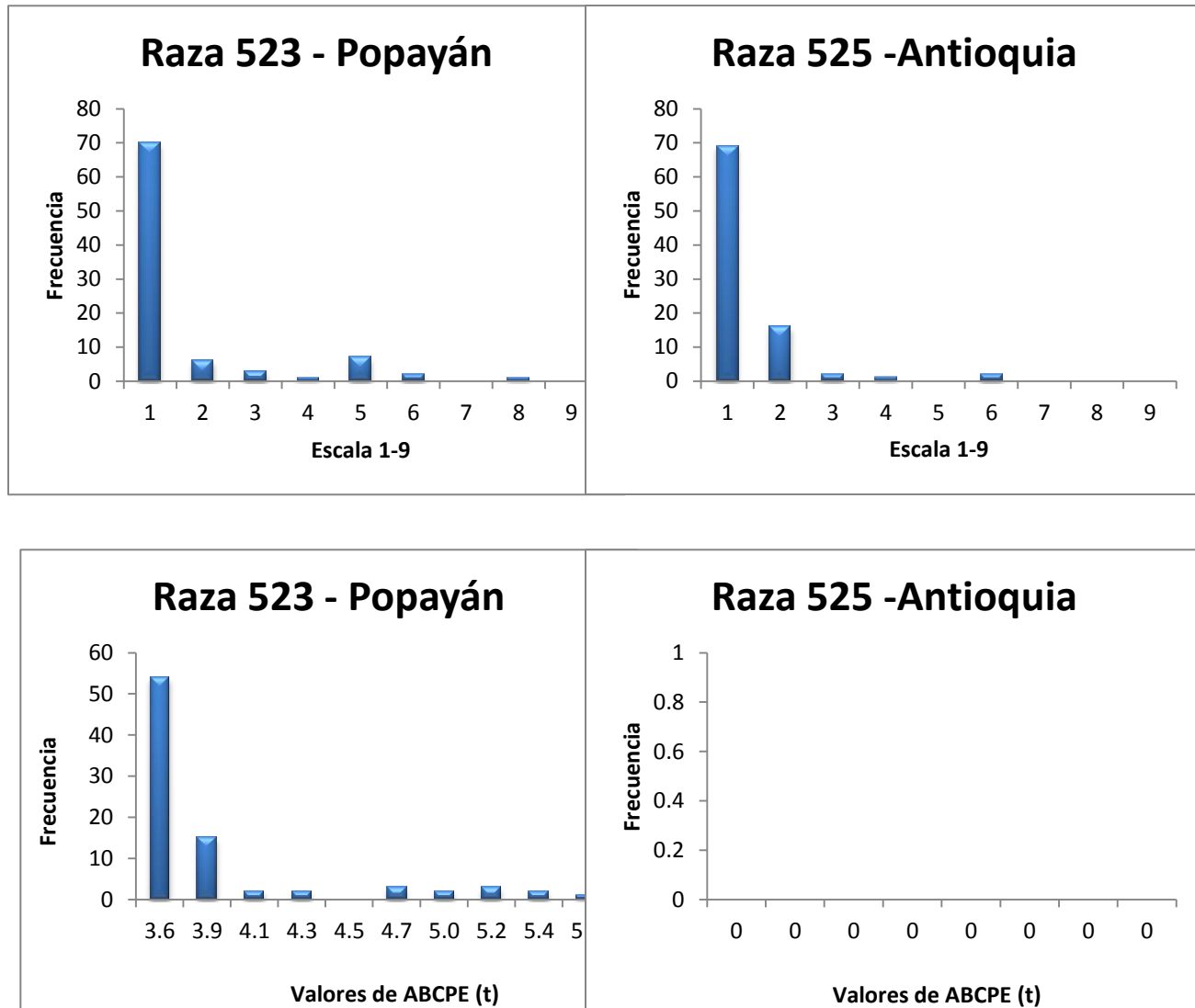
Evaluación en Antioquia							
Días después de la siembra (dds)	40	56	64	77	94	103	116
Días después de la inoculación (ddi)	0	16	24	37	54	63	76
Inoculación							
Evaluación de severidad en hoja							

Figura 4- 3. Síntomas de infección por *C. lindemuthianum* en hoja y vainas de frijol.



La eficiencia relativa del diseño lattice con respecto a bloques completos al azar (BCA) fue menor al 105 %, por lo tanto los datos fueron analizados como un BCA. De acuerdo a la prueba de Levene aplicada, los datos no tenían una distribución normal, por lo tanto se realizó una transformación logarítmica (x+1). La Figura 4-4 muestra los histogramas obtenidos con los con los valores de la escala 1-9 y con los valores de ABCPE transformados, tanto para la evaluación realizada en Popayán con la raza 523 como para la realizada en Antioquia con la raza 525.

Figura 4- 4. Distribución de los valores fenotípicos en la evaluación de las razas 523 y 525 en condiciones de campo.



4.2.3 Identificación de QTL

Para la identificación de QTL, los datos obtenidos mediante las evaluaciones fenotípicas se compararon con los datos genotípicos del Capítulo 3 para la población G2333 x G19839. Este mapa estuvo constituido por 298 marcadores de los cuales 155 corresponden a marcadores microsatélite asociados a homólogos de genes de resistencia (RGH-SSR o BMr-Bean Microsatellite associated to resistance).

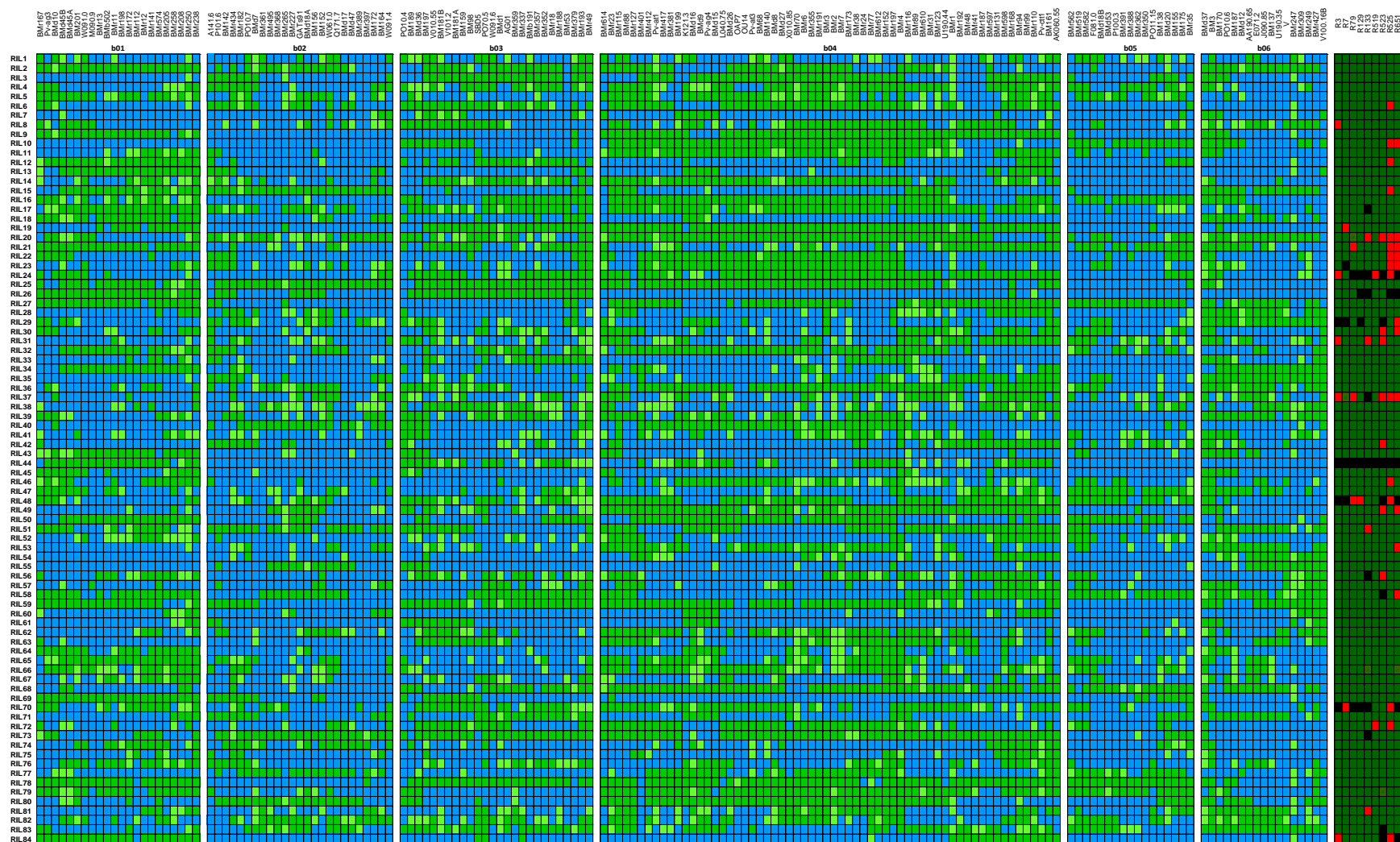
La Figura 4-5 presenta de manera gráfica los valores genotípicos y fenotípicos para cada una de las RIL. Alelos provenientes de G2333 se representaron con el color azul, el color verde oscuro representa alelos provenientes de G19839 y el color verde claro los datos perdidos (no amplificaron, alelos raros o heterocigotos). Para los valores fenotípicos, las líneas resistentes se representan con color verde oscuro, la resistencia intermedia con el color rojo y las líneas susceptibles con color negro.

Para el análisis de QTL se utilizaron los datos fenotípicos correspondientes a la respuesta de resistencia de las líneas RIL G2333 x G19839, al ser inoculadas con nueve aislamientos de *C. lindemuthianum*, bajo condiciones controladas en invernadero (correspondientes a las razas 3, 7, 79, 129, 133, 519, 523, 525 y 651) y dos aislamientos evaluados en campo (correspondientes a la raza 523 evaluada en Popayán y 525 evaluada en Antioquia).

Para los aislamientos evaluados en campo no se identificaron QTLs al realizar el análisis de intervalo ni el análisis de intervalo compuesto por cromosoma, por lo tanto los resultados que se describen a continuación hacen referencia a los análisis con las evaluaciones en invernadero.

Al realizar el análisis de QTL mediante mapeo por intervalo, no se identificaron QTLs cuando se utilizaron los siguientes valores: porcentaje de área foliar afectada (AFA) y valores de severidad de 0 a 100% (valores discriminados en la Tabla 4-1). Es necesario aclarar que al pasar los valores de la escala 1-9 a porcentaje (AFA 0-25% o severidad 0-100%) los datos no presentaron una distribución normal, por lo tanto se transformaron con logaritmo ($x+1$) y con este valor se realizaron los análisis de QTL. Los QTL identificados utilizando el valor promedio de la escala 1-9 y el valor de la escala 1-9 transformado con logaritmo, se presentan en la Tabla 4-7. Con los valores de severidad de la escala 1-9 solamente se identificó 1 QTL, mientras que con los valores de la escala 1-9 transformados se identificaron 10 QTL localizados en los grupos de ligamiento b03, b04, b08, b09 y b11 y asociados a las razas 79, 129, 523, 525 y 651. En los grupos de ligamiento b08 y b11 se presentaron los QTL con los valores más altos de LOD y R^2 .

Figura 4- 5. Matriz genotípica y fenotípica de la población RIL G2333 x G19839.



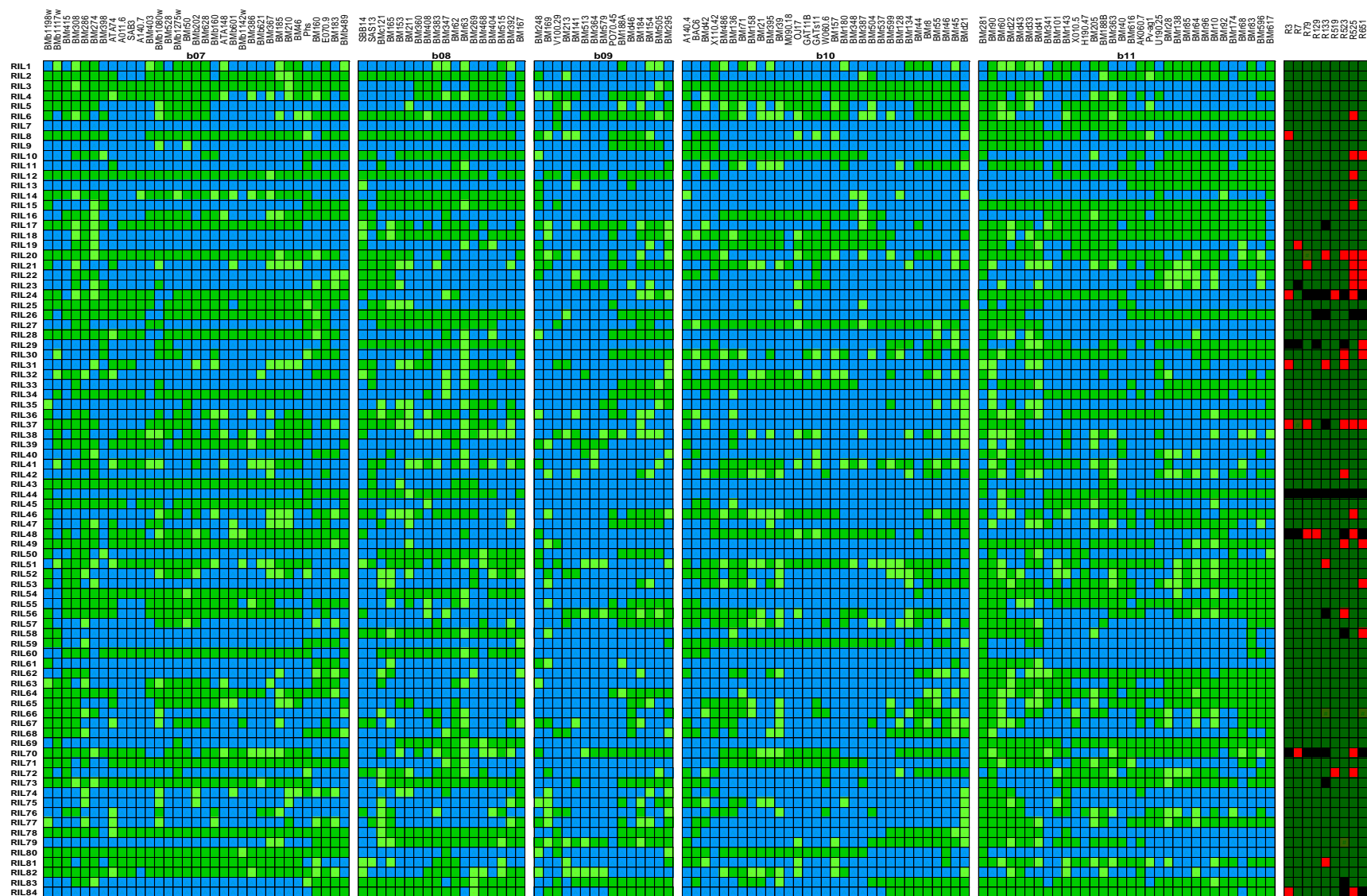


Tabla 4- 7. QTL identificados con los valores de la escala 1-9 y los valores de la escala 1-9 transformados, mediante mapeo por intervalo.

Valor utilizado para el análisis	Raza	Locus	GL	LOD	Aditividad	R ²
Escala 1-9	R525	SBB14	8	5.8307	0.9062	0.29
Escala 1-9 transformada con log	R79	BMr188	3	2.6293	-0.1523	0.14
Escala 1-9 transformada con log	R129	BMr53	3	2.9306	-0.1847	0.14
Escala 1-9 transformada con log	R523	BMr192	4	3.2403	-0.2982	0.29
Escala 1-9 transformada con log	R523	BMr48	4	3.102	-0.2943	0.29
Escala 1-9 transformada con log	R523	SBB14	8	2.8241	-0.2536	0.14
Escala 1-9 transformada con log	R525	SBB14	8	6.9342	-0.2894	0.31
Escala 1-9 transformada con log	R525	SAS13	8	20.1808	-0.5588	0.89
Escala 1-9 transformada con log	R651	SBB14	8	3.0214	-0.2418	0.14
Escala 1-9 transformada con log	R79	BMr579	9	8.2117	-0.5555	0.74
Escala 1-9 transformada con log	R525	*Pv-ag1	11	3.1008	-0.198	0.14

Teniendo en cuenta que con el análisis de intervalo no se identificaron QTL con los valores correspondientes a porcentaje (AFA 0-25% y severidad 0-100%), el análisis de QTL con mapeo de intervalo compuesto (MIC) por cromosoma, se realizó solo con los valores de la escala 1-9 y los valores de la escala 1-9 transformados con logaritmo.

La Tabla 4-8 muestra un resumen el número de QTL identificados por CIM, al utilizar los valores de la escala 1-9 y los valores de la escala 1-9 transformados con logaritmo. Adicionalmente se presentan los valores mínimos y máximos de la varianza fenotípica (R^2) y el LOD para cada una de las nueve razas evaluadas. Utilizando los valores de la escala 1-9 se identificaron 31 QTL, mientras que con los valores de la escala transformada se identificaron 21 QTL. Los valores más altos de LOD y de varianza fenotípica explicada por los QTL, por lo general fueron mayores con los valores de la escala transformada con logaritmo. Por ejemplo, el QTL que explicó el valor más alto de varianza fenotípica se identificó al realizar el análisis para la raza 525, donde se obtuvo un R^2 de 0.89 al utilizar los valores de la escala 1-9 transformados, la varianza fenotípica utilizando los valores de la escala 1-9 también fue alta, pero considerablemente menor al valor anterior ($R^2 = 0.29$). El umbral o valor LOD para los QTL identificados varió entre 1.58 y 5.83 con un promedio de 2.50 cuando se utilizaron los valores de la escala 1-9, estos valores correspondieron a 1.44 y 20.18 con un promedio de 3.23 con los valores de la escala 1-9 transformados.

Tabla 4- 8. Resumen de los QTL identificados al utilizar los valores de la escala 1-9 y los valores transformados con logaritmo, por medio de CIM.

Raza	Escala 1-9					Escala 1-9 transformada con log				
	No. QTL	R ² Min	R ² Max	LOD Min	LOD Max	No. QTL	R ² Min	R ² Max	LOD Min	LOD Max
R3	4	0.09	0.12	1.68	2.33	1	0.10	0.10	1.84	1.84
R7	1	0.09	0.09	1.79	1.79	2	0.09	0.10	1.72	1.73
R79	3	0.08	0.12	1.58	2.43	3	0.08	0.13	1.44	2.63
R129	1	0.15	0.15	2.88	2.88	1	0.15	0.15	2.93	2.93
R133	8	0.09	0.14	1.62	2.49	6	0.09	0.16	1.71	2.48
R519						1	0.09	0.09	1.68	1.68
R523	4	0.13	0.19	1.77	3.84	1	0.16	0.16	2.82	2.82
R525	7	0.09	0.29	1.71	5.83	5	0.10	0.89	1.73	20.18
R651	3	0.10	0.18	1.75	3.62	1	0.15	0.15	3.02	3.02
Total	31					21				

Dado que los valores más altos de R^2 y LOD se obtuvieron al utilizar los valores transformados con logaritmo, los siguientes resultados y se realizan con base en estos valores.

Para la nomenclatura de los QTL se utilizó la sigla ANT (por QTL asociado con resistencia a antracnosis), seguido de un número que indica el grupo de ligamiento en el cual está localizado el QTL, posteriormente se indica el número que le corresponde a cada QTL, nombrando primero los que obtuvieron los valores más altos de LOD y R^2 y finalmente el superíndice indica la población en la cual fue identificado el QTL. Por ejemplo el QTL ANT3.1^{GG}, hace referencia a uno de los siete QTL identificados en el grupo de ligamiento b03, y se denominó de primeras por tener el valor LOD más alto.

Los 21 QTL identificados, estuvieron asociados con las nueve razas de *C. lindemuthianum* evaluadas: 3, 7, 79, 129, 133, 519, 523, 525 y 651 y se distribuyeron en seis grupos de ligamiento: b01, b03, b06, b07, b08 y b11 (Figura 4-6). La Tabla 4-9 discrimina esta información para cada uno de los QTL y adicionalmente se diferencia la raza a la que estuvo asociado el loci, el grupo de ligamiento en el cual se localizó y el valor de aditividad. En la Figura 4-4 se muestran los QTL identificados en los diferentes grupos de ligamiento, solo se señalan los diez QTL que presentaron un valor LOD superior a 3.0.

Tabla 4- 9. Resumen de QTL asociados con resistencia a *C. lindemuthianum* en la población RIL G2333 x G19839, mediante mapeo por intervalo.

QTL	Raza	Locus	GL	LOD	Aditividad	R ²
ANT1.1 ^{GG}	R519	M090.9	1	1.68	-0.70	0.09
ANT1.2 ^{GG}	R79	BMd10	1	1.44	-0.47	0.08
ANT3.1 ^{GG}	R129	BMr53	3	2.93	-0.18	0.15
ANT3.2 ^{GG}	R79	BMr188	3	2.63	-0.15	0.13
ANT3.3 ^{GG}	R79	BM181A	3	2.07	-0.15	0.13
ANT3.4 ^{GG}	R133	BMd36	3	1.91	-0.19	0.11
ANT3.5 ^{GG}	R525	V101.2	3	1.88	-0.15	0.10
ANT3.6 ^{GG}	R7	BMr188	3	1.72	-0.15	0.10
ANT3.7 ^{GG}	R133	BMr18	3	1.71	-0.18	0.09
ANT6.1 ^{GG}	R133	BMd37	6	2.48	0.25	0.16
ANT6.2 ^{GG}	R525	BMr427	6	1.73	0.17	0.12
ANT6.3 ^{GG}	R133	PO10.6	6	1.72	0.17	0.09
ANT7.1 ^{GG}	R133	BM185	7	2.04	-0.19	0.11
ANT8.1 ^{GG}	R525	SAS13	8	20.18	-0.56	0.89
ANT8.2 ^{GG}	R525	SBB14	8	6.93	-0.29	0.34
ANT8.3 ^{GG}	R651	SBB14	8	3.02	-0.24	0.15
ANT8.4 ^{GG}	R523	SBB14	8	2.82	-0.25	0.16
ANT8.5 ^{GG}	R3	SBB14	8	1.84	-0.15	0.10
ANT8.6 ^{GG}	R133	SBB14	8	1.75	-0.18	0.09
ANT8.7 ^{GG}	R7	SBB14	8	1.73	-0.13	0.09
ANT11.1 ^{GG}	R525	Pv-ag1	11	3.10	-0.20	0.16

* El signo – indica el efecto positivo del alelo G2333 y el signo + el efecto positivo del alelo de G19839.

De los 21 loci asociados con resistencia, la mayoría (17 QTL, 86%) fue aportado por el parental G2333. Los QTL aportados por el parental G19389 correspondientes a ANT6.1, ANT6.2 y ANT6.3, siempre mapearon en el grupo de ligamiento b06 y estuvieron asociados con resistencia a las razas 133 y 525.

Siete QTL (33%) se localizaron en el grupo de ligamiento b03, donde se identificaron QTL asociados a cinco de las nueve razas evaluadas: 7, 79, 129, 133 y 525. El mismo número de QTL se identificó en el grupo de ligamiento b08 con QTL asociados con resistencia a seis razas: 3, 7, 133, 523, 525 y 651. En los grupos de ligamiento b01, b06, b07 y b11 se localizaron uno, dos o tres QTL. La distribución de QTL a través de los grupos de ligamiento se muestra en la Figura 4-7.

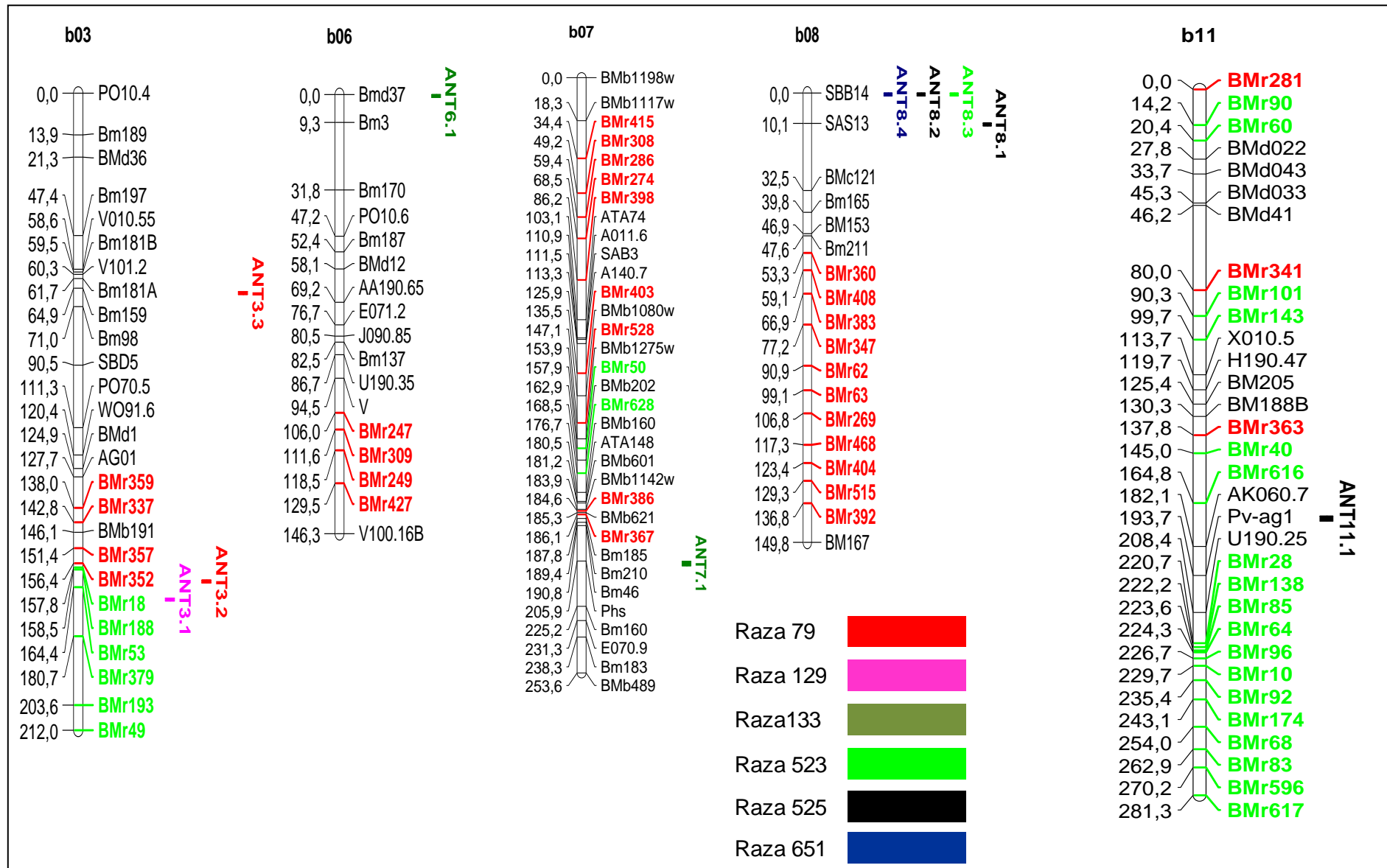
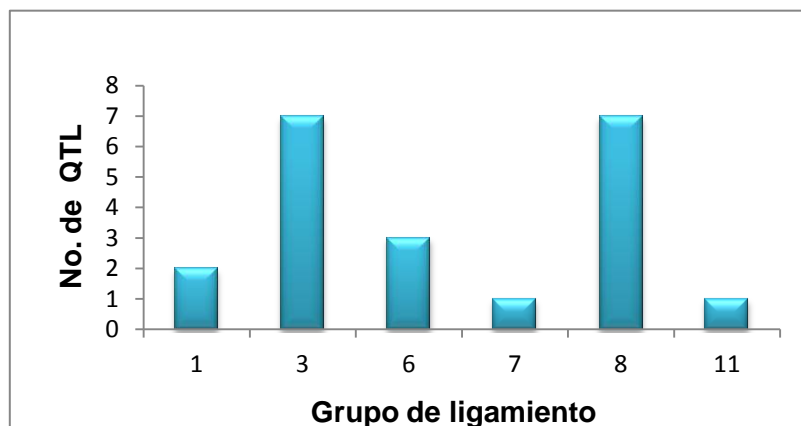
Figura 4- 6. QTL localizados en los diferentes grupos de ligamiento mediante mapeo por intervalo compuesto.

Figura 4- 7. Número de QTL asociados en cada grupo de ligamiento.

Las permutaciones permitieron establecer el umbral dado en valores LOD para cada uno de los QTL. En el grupo de ligamiento b01, se identificaron los QTL ANT1.1 y ANT1.2 asociados con resistencia a las razas 519 y 79, sin embargo los valores LOD, fueron inferiores a 2.0.

En el grupo de ligamiento b03 se identificaron los QTL ANT3.1^{GG}, ANT3.2^{GG} y ANT3.3^{GG} asociados con la resistencia a las razas 79 y 129, los valores LOD de estos QTL (2.07 y 2.93) fueron los más altos para este grupo y explicaron varianzas fenotípicas entre 13 y 15%. Adicionalmente se identificaron los QTL ANT3.4^{GG}, ANT3.5^{GG}, ANT3.6^{GG} y ANT3.7^{GG}, los cuales explicaron de un 9 a un 11% de la resistencia frente a las razas 7, 133 y 525. Esto puede indicar que este grupo de ligamiento presenta una región importante que confiere resistencia a *C. lindemuthianum*.

En el grupo de ligamiento b06 se identificaron 3 QTL, dos asociados con la raza 133 y uno con la raza 525. El QTL ANT6.1^{GG}, fue el que presentó el valor LOD más alto (2.84) y el que explico la mayor varianza fenotípica en este grupo de ligamiento (16%).

En el grupo de ligamiento b07 se identificó el QTL ANT7.1^{GG}, con un valor LOD de 2.04 y explico un 11% de la resistencia frente a la raza 133.

El grupo de ligamiento b08 se confirmó como una de las regiones más importantes que confieren resistencia a antracnosis. En la región telomérica del brazo corto, se identificó dos de los QTL con los mayores valores de LOD. El ANT8.1^{GG} tuvo un LOD de 20.18 y

explicó el 89% de la resistencia frente a la raza 525. El ANT8.2^{GG}, presentó el segundo valor LOD más alto correspondiente a 6.93 y explicó un 34% de la resistencia frente a la raza 525. Adicionalmente, se identificaron los QTL ANT8.3^{GG} y ANT8.4^{GG} asociados con el marcador SBB14, con valores LOD de 3.02 y 2.82 y explicaron el 15 y 16% de la resistencia frente a las razas 651 y 523 respectivamente. Los QTL ANT8.5^{GG}, ANT8.6^{GG} y ANT8.7^{GG} explicaron entre el 9 y 10% de la resistencia frente a las razas 3, 133 y 7, aunque con valores LOD de 1.73 y 1.84.

En el grupo de ligamiento b11 se identificó el locus Pv-ag1 como una región importante que confiere resistencia a la raza 525, el valor LOD fue alto (3.1) y la varianza fenotípica explicada fue de 16%.

El mayor número de QTL, estuvo asociado con la resistencia a la raza 133, para la cual se identificaron seis loci, cuatro provenientes de G2333 (ANT6.2^{GG}, ANT6.4^{GG}, ANT6.5^{GG} y ANT6.6^{GG}) y dos de G19839 (ANT6.1^{GG} y ANT6.3^{GG}). En segundo lugar se encuentran los cinco QTL asociados con resistencia frente a la raza 525, correspondientes a ANT3.5^{GG}, ANT6.2^{GG}, ANT8.1^{GG}, ANT8.2^{GG} y ANT11.1^{GG}; dentro de este grupo el ANT6.2^{GG} fue el único proveniente de G19839. Los QTL ANT1.2^{GG}, ANT3.2^{GG} y ANT3.3^{GG} fueron los únicos asociados con resistencia a la raza 79 y en el caso de QTL asociados con resistencia a la raza 7 se identificaron ANT3.6^{GG} y ANT8.7^{GG}. Para las razas 3, 129, 519, 523 y 651 solamente se identificó un QTL.

Los 21 loci estuvieron asociados a 15 marcadores diferentes, de los cuales 4 (27%) correspondieron a marcadores BMr o RGH-SSR, 6 (40%) a SSRs, 2 (13%) a SCARs y 3 (20%) a RAPDs (Tabla 4-10). Dentro de todos los marcadores, el SCAR SBB14 fue el que presentó el mayor número de QTL asociados (6 QTL, 29%).

Tabla 4- 10. Marcadores asociados a QTL donde se discrimina el grupo de ligamiento, la raza y el tipo de marcador.

Locus	QTL	GL	Raza	Tipo de marcador
BM181A	ANT3.3GG	3	R79	SSR
BM185	ANT7.1GG	7	R133	SSR
BMd10	ANT1.2GG	1	R79	SSR
BMd36	ANT3.4GG	3	R133	SSR
BMd37	ANT6.1GG	6	R133	SSR
BMr18	ANT3.7GG	3	R133	RGH-SSR
BMr188	ANT3.2GG	3	R79	RGH-SSR
	ANT3.6GG		R7	
BMr427	ANT6.2GG	6	R525	RGH-SSR
BMr53	ANT3.1GG	3	R129	RGH-SSR
M090.9	ANT1.1GG	1	R519	RAPD
PO10.6	ANT6.3GG	6	R133	RAPD
Pv-ag1	ANT11.1GG	11	R525	SSR
SAS13	ANT8.1GG	8	R525	SCAR
SBB14	ANT8.2GG	8	R525	SCAR
	ANT8.3GG		R651	
	ANT8.4GG		R523	
	ANT8.5GG		R3	
	ANT8.6GG		R133	
	ANT8.7GG		R7	
V101.2	ANT3.5GG	3	R525	RAPD

Al comparar los QTL identificados con mapeo por intervalo y CIM (Tablas 4-7 y 4-9, respectivamente), se observa que la mayoría de los QTL identificados por CIM (70%), también se reportaron en mapeo por intervalo (ANT3.1GG, ANT3.2GG, ANT8.1GG, ANT8.2, ANT8.3, ANT8.4 y ANT11.1) con valores LOD altos entre 20.18 y 2.63 y varianzas fenotípicas entre 13 y 89%. Solo tres QTL que fueron identificados únicamente con CIM (ANT3.3^{GG}, ANT6.1^{GG} y ANT7.1^{GG}), tuvieron valores LOD superiores a 2.0 y explicaron varianzas fenotípicas entre 15 y 19%. Los QTL restantes (ANT1.1^{GG}, ANT1.2^{GG}, ANT3.4^{GG}, ANT3.5^{GG}, ANT3.6^{GG}, ANT3.7^{GG}, ANT6.2^{GG}, ANT6.3^{GG}, ANT8.5^{GG}, ANT8.6^{GG} y ANT8.7^{GG}), presentaron valores LOD inferiores a 2.0 y explicaron varianzas fenotípicas entre 8 y 12%.

Se utilizó el programa GMM para la detección de la interacción entre diferentes loci, mediante la comparación de los datos genotípicos y fenotípicos. La Tabla 4-11 presenta un resumen de las interacciones identificadas. Se discrimina la raza en la cual la interacción tiene efecto, los valores de F, MSA (varianza entre clases), MSW (varianza dentro de clases) y MST (varianza total); adicionalmente se especifica el locus involucrado y el grupo de ligamiento en el que se encuentra cada locus.

Por ejemplo, la combinación del marcador BM213, SBB14 y BMr265 influencia la resistencia de las líneas RIL G2333 x G19839 hacia la raza 525.

Tabla 4- 11. Interacciones génicas entre loci en la población G2333 X G19839

Raza	F	MSA	MSW	MST	1- MSW/MST	Locus (alelo)	GL	Locus (alelo)	GL	Locus (alelo)	GL
R3	124.3	9.6	0.08	0.25	0.69	BMr362	b05	BMr48	b04	BMd001	b03
R129	504.7	15.3	0.03	0.37	0.92	BMr10	b11	BMd020	b05	BMd001	b03
R519	478.6	3.9	0.01	0.07	0.88	BMr49	b03	BMr359	b03	BM181A	b03
R523	108.9	13.6	0.12	0.40	0.69	BMd41	b11	OJ17	b10	BMr337	b03
R525	125.5	17.4	0.14	0.44	0.69	BM213	b09	SBB14	b08	BMr265	b02
R525	125.4	15.9	0.13	0.36	0.65	BM213	b09	SBB14	b08	BMr368	b02
R525	118.6	16.8	0.14	0.42	0.66	SBB14	b08	BMr368	b02	BMr182	b02
R651	81.2	17.0	0.21	0.45	0.54	BMr486	b10	SBB14	b08	BMr368	b02

La Figura 4-8A muestra un ejemplo gráfico de una interacción obtenida por medio del programa GMM. Se observan cinco matrices, una para cada marcador implicado en la interacción. Una matriz tiene todas las posibles combinaciones alélicas en cada marcador y cada celda indica el efecto de un QTL de manera individual. En este caso al ser una población RIL las combinaciones esperadas son AA (o aa) y BB (o bb). El valor F (magnitud del efecto de un QTL de manera individual) se representa con diferentes tonalidades de azul, y los valores más altos tienen los colores más oscuros. Las líneas trazadas entre las diferentes matrices indican la interacción de los QTL. El valor F indica la magnitud de la interacción y está representado con colores de amarillo a rojo, siendo este ultimo color el que indica la interacción más fuerte (Isobe et al., 2007). Esta misma información se presenta en la Figura 4-8B, donde se muestran los once grupos de

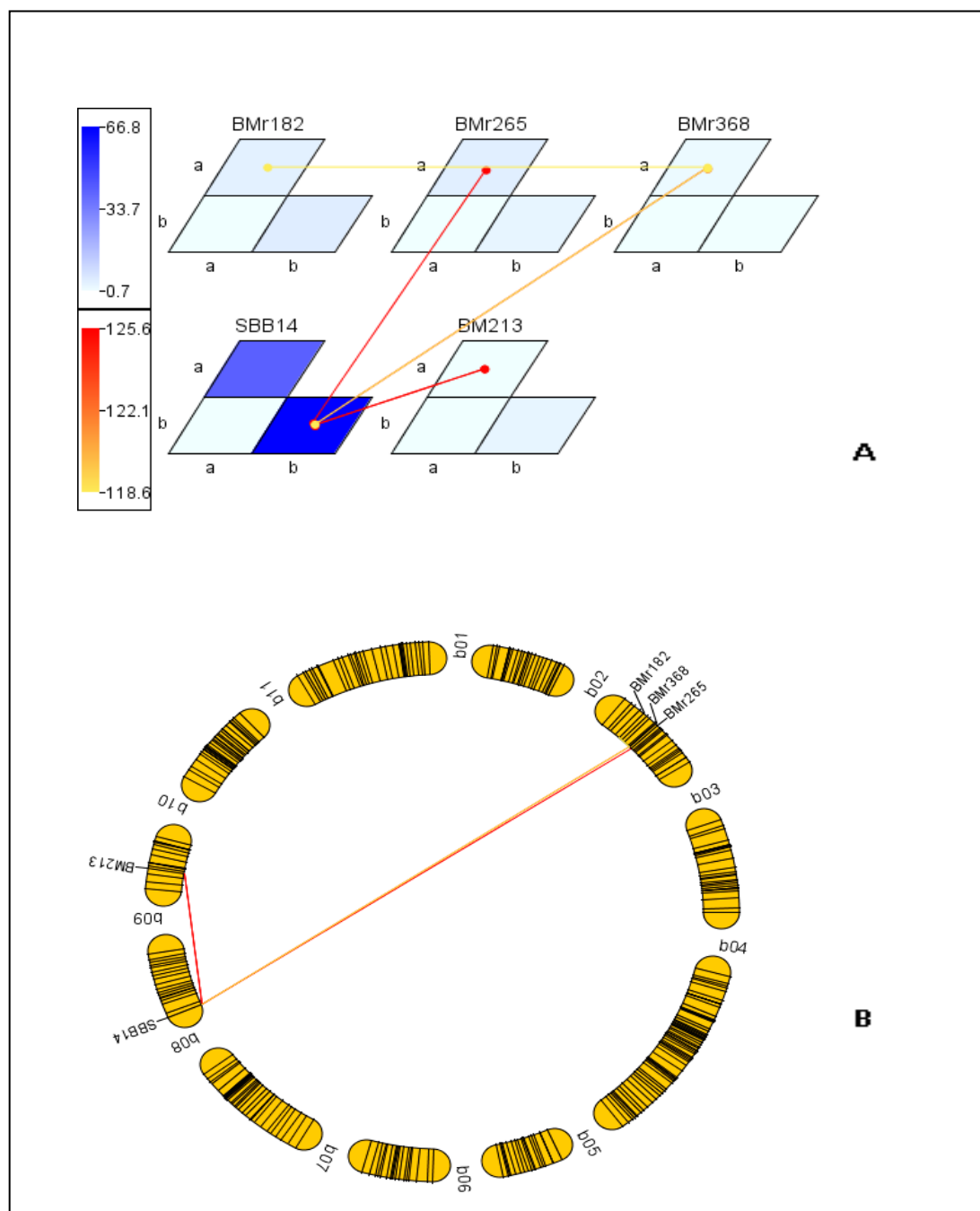
ligamiento de frijol y los loci que están interactuando, conectados por líneas de diferentes colores que indican la magnitud de la interacción.

El locus SBB14 se identificó en el 50% de interacciones, lo cual indica que este locus afecta la respuesta de resistencia frente a las razas 525 y 651 a través de la múltiples combinaciones con los loci: BM213, BMr182, BMr265 y BMr368.

Mediante el estudio de las interacciones génicas entre loci, se identificaron algunas regiones que no fueron reportadas por las técnicas de mapeo desarrolladas anteriormente (mapeo por intervalo y CIM). Por ejemplo, el locus BMr368 estuvo involucrado en tres interacciones génicas: con los loci SBB14 y BMr182; con los loci BM213 y el BMr486 y una interacción final con BM213 y SBB14; todas asociadas con la respuesta de resistencia frente a la raza 525. Así mismo, los marcadores BMr10, BMr182, BMr265, BMr337, BMr359, BMr362, BMr486 y BMr49, los cuales no estuvieron asociados con regiones de resistencia mediante las evaluaciones con las diferentes metodologías de mapeo de QTL, se identificaron como loci importantes en resistencia a diferentes razas de *C. lindemuthianum* a través de interacciones génicas.

Tres de las ocho interacciones génicas identificadas estuvieron asociadas con la resistencia a la raza 525 y las demás interacciones estuvieron relacionadas con la respuesta hacia las razas 3, 129, 519 y 651.

Figura 4- 8. Interacción entre QTL, al evaluar la raza 525 de *C. lindemuthianum*, en la población G2333xG19839.



4.3 Discusión

El presente trabajo permitió identificar algunas regiones asociadas con resistencia a diferentes razas de *C. lindemuthianum*, específicamente para la población RIL G2333 x G19839, mediante el uso de una matriz genotípica compuesta por 298 marcadores y evaluaciones fenotípicas realizadas en invernadero.

En la identificación de QTL se utilizaron diferentes valores (o escalas), teniendo en cuenta que para las evaluaciones fenotípicas la resistencia o susceptibilidad, se determinó con la escala de evaluación 1-9 propuesta por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987). Algunos autores consideran que al ser una variable ordinal, no es necesario hacer un análisis específico, simplemente transformar los datos con logaritmo (comn. personal con Shizhong Xu). Sin embargo, otros investigadores consideran necesario convertir los datos teniendo en cuenta el porcentaje de área foliar afectada (comn. personal con Miryam Cristina Duque). Al respecto, parece no haber un consenso, por tal razón se decidió evaluar los datos de cuatro formas diferentes. Primero se utilizó el valor promedio de la evaluación en la escala 1-9, segundo se utilizó el valor de escala 1-9 transformado con logaritmo ($x+1$), tercero los valores de la escala 1-9 fueron convertidos a porcentaje de acuerdo a lo descrito por Van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987) con valores de 0 a 25% de AFA, y finalmente se utilizó una escala también de severidad pero con valores de 0 a 100%. Se considero que los mejores resultados fueron obtenidos con los valores de la escala 1-9 transformados con logaritmo, puesto que los loci identificados presentaron los valores LOD y R^2 más altos y se identificaron tanto por mapeo por intervalo como por mapeo por intervalo compuesto.

Para todas las evaluaciones fenotípicas realizadas de resistencia/susceptibilidad, algunas líneas presentaron un valor de 1 (en la escala de evaluación 1-9), lo que corresponde a 0% de área foliar afectada (AFA). Por lo tanto al hacer las correspondencias de los valores de la escala 1-9 en porcentaje de AFA, tanto para la escala de 0 a 25% como para la escala de 0 a 100% se presentaron muchas líneas con valores de cero. Al no tener una

distribución normal, también fue necesario transformar estos valores con logaritmo para realizar el análisis de QTL. Los métodos utilizados para la transformación de los datos, algunas veces no son tan eficientes cuando se presentan muchos valores extremos como el cero (Mao y Xu, 2004). Esto pudo haber limitado el poder identificar los QTLs con este tipo de escalas. En el caso de los valores correspondientes a la escala 1-9, sólo se identificó un QTL cuando se realizó mapeo por intervalo y con CIM se identificaron muchos QTLs con bajo LOD y R^2 . Esto se debe a que los datos no presentaron una distribución normal, por lo tanto era necesario realizar la transformación para obtener QTL más estables y confiables.

Aunque en el presente trabajo con los valores correspondientes a porcentaje de área foliar afectada no se identificaron QTL, estos son valores con gran utilidad en el mapeo de características cuantitativas y especialmente en el mapeo de regiones asociadas con resistencia, debido a que las escalas de evaluación utilizadas por lo general corresponden a variables ordinales. Tal vez al tener evaluaciones fenotípicas con distribución normal, se refleje la utilidad de este tipo de escalas.

Muchas características cuantitativas son medidas como porcentaje y se asume la distribución normal de los residuales, por lo que la transformación apropiada de los datos se recomienda antes de realizar los análisis para incrementar el poder estadístico en la detección de QTL (Mao y Xu, 2004). En el caso de frijol para la evaluación de resistencia/susceptibilidad a antracnosis, el mayor valor en porcentaje de AFA corresponde a un 25%, asumiendo que si la planta no tiene la capacidad de generar nuevo tejido foliar a una tasa mayor a la que el patógeno coloniza los tejidos, este porcentaje es suficiente para matar la planta. Sin embargo, es necesario tener en cuenta las características específicas de la variedad que se esté evaluando y el momento del ciclo de cultivo en el que se realice la evaluación. Aunque en el presente estudio no se identificaron QTL al utilizar la escala de evaluación propuesta de severidad que iba de 0 a 100%, esta puede ser útil para la evaluación de materiales que presenten recuperación a los procesos de infección, mediante la generación de tejido sano. Además este tipo de evaluación permitiría distinguir materiales con diferentes grados de infección, por ejemplo una planta con un 25% de AFA con una que presente 50% de AFA.

Adicionalmente, los métodos tradicionales de mapeo de QTL que se realizan con porcentaje deben tener en cuenta como estos valores son medidos. El mismo valor de porcentaje (por ejemplo 50%) en diferentes tamaños de muestra (por ejemplo 2/4 y 20/40) tiene diferente varianza del error residual y por lo tanto puede dar estimaciones diferentes (Mao y Xu, 2004).

También sería importante establecer si la planta presenta tolerancia a la enfermedad a pesar de verse seriamente afectada por el patógeno. Al respecto es necesario tener clara la diferencia entre resistencia y tolerancia, pues muchas veces estos son términos son tratados de manera indistinta. La tolerancia puede ser definida como la capacidad de un cultivar para reducir las pérdidas en calidad o producción, debido a la severidad de la enfermedad o desarrollo del patógeno, cuando se compara con otros cultivares o cultivos (Schafer, 1971). Los beneficios de la tolerancia han sido subestimados y no ha sido ampliamente explotada en los programas de mejoramiento, porque su uso representa una desmejora en la calidad estética de la planta, que por lo general buscan los agricultores. Uno de los factores que explica esto es que la evaluación de la tolerancia es difícil, porque la mayoría de las evaluaciones se realizan en condiciones de invernadero y en etapas iniciales de desarrollo, de esta manera no se puede estimar si el material que presenta síntomas y/o signos de la enfermedad, tiene potencial en la producción.

Aunque en la mayoría de trabajos de QTL reportan evaluaciones fenotípicas ya sea en invernadero o en campo, en el presente trabajo se quiso realizar la comparación del análisis de QTL en ambas condiciones. La respuesta de resistencia de un genotipo, puede variar al realizar las evaluaciones bajo condiciones controladas como invernaderos o cámaras húmedas versus experimentos en campo, debido a que las plantas están expuestas a diferentes efectos ambientales. Algunos estudios han mostrado la expresión de QTL que son dependientes del estado de desarrollo de la planta.

Adicionalmente, en algunas interacciones planta-patógeno, se ha descrito tanto la resistencia monogénica, como la resistencia cuantitativa y se ha observado una

distribución binomial en las pruebas realizadas en plántulas con un aislamiento específico y una distribución fenotípica continua cuando las evaluaciones se realizan en estado de planta adulta bajo condiciones de campo (Keller et al., 2000).

Por ejemplo, Ferreira et al. (1995) identificó regiones genómicas asociadas con resistencia a la enfermedad denominada “pie negro” (*Leptosphaeria maculans*) en *Brassica napus*, al realizar las evaluaciones en cámaras de crecimiento. Sin embargo, ninguna de estas regiones estuvo asociada a la resistencia cuando las evaluaciones se realizaron en campo. Así mismo, en el trabajo realizado para la identificación de QTL asociados a “la mancha borrosa (“Spot blotch”) en cebada (*Hordeum vulgare*), un QTL mayor identificado en estado de plántula, solo explicó el 9% de la resistencia en plantas adultas, y un QTL que explicaba el 62% de la resistencia en campo no se identificó en el estado de plántula (Steffenson et al., 1996).

En el presente trabajo no se dieron las condiciones necesarias en campo para el desarrollo y establecimiento de *C. lindemuthianum* en campo. Como se ha definido para que se produzca una enfermedad debe contarse con todos los factores del “triángulo de la enfermedad” (Agrios, 2005). Es decir, se deben dar las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo del patógeno, se debe contar con un hospedero susceptible y la presencia del patógeno.

En el ensayo llevado a cabo en Popayán se contaba con el hospedero susceptible (dado por los esparcidores y las líneas endogámicas susceptibles), y con el patógeno (dado por las inoculaciones artificiales que se realizaron, siguiendo los estándares utilizados tanto en programas de fitomejoramiento como de fitopatología), sin embargo, no se dieron las condiciones ambientales necesarias para que *C. lindemuthianum* se estableciera e infectara en los niveles esperados en la población RIL.

Para el caso de la evaluación realizada en Rio Negro - Antioquía, se contó con el hospedero susceptible y las condiciones ambientales favorables. Sin embargo, la presencia de ascochyta (*Phoma exigua* var. *diversispora*) con altos niveles de incidencia (casi 100%) y severidad (un 83% de las líneas presentaron valores entre 6 y 7 en la escala de evaluación 1-9, en etapas avanzadas del cultivo) pudo “competir” con el patógeno causante de la antracnosis y alterar la infección por *C. lindemuthianum*.

La diferencia en la respuesta de resistencia de acuerdo al estado de la planta para antracnosis en frijol ha sido descrita previamente. Pastor-Corrales et al. (1985) al estudiar la reacción de genotipos de frijol al ser inoculados con aislamientos de *C. lindemuthianum* tanto en condiciones de campo como en invernadero identificaron plantas que presentaron la misma reacción en todos los estados de desarrollo de la planta (resistentes, resistentes intermedios y susceptibles), y también se presentaron genotipos altamente susceptibles en estado de plántula pero resistentes en planta adulta.

En las evaluaciones realizadas en invernadero, al tener la temperatura y humedad controladas, se crearon las condiciones ambientales para el desarrollo de *C. lindemuthianum*, de esta manera los materiales susceptibles fueron infectados. Todas las líneas susceptibles en campo, presentaron el mismo fenotipo en las pruebas de invernadero. Por el contrario, no se presentó ninguna línea susceptible en campo y resistente en invernadero. Esto indica que la evaluación en invernadero permite tener una buena estimación de la resistencia o susceptibilidad de cada línea. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es necesario realizar evaluaciones en campo, que permitan corroborar si las regiones genómicas asociadas con resistencia bajo condiciones de invernadero también se identifican bajo condiciones naturales o de campo.

Desafortunadamente dentro de los aislamientos evaluados y disponibles en el laboratorio de fitopatología de CIAT, no fue posible contar con razas que presentaran genes de avirulencia compatibles con los genes de resistencia presentes en G2333 y de esta manera eliminar la resistencia dada por los genes mayores hasta ahora identificados en este genotipo (Vallejo y Kelly, 2009). La limitación en la falta de aislamientos patogénicos hacia G2333, se debe a que las únicas razas que han logrado causar síntomas de enfermedad en G2333 son Mesoamericanas y fueron identificadas en Costa Rica, por lo tanto Colombia no cuenta con estos aislamientos y tampoco se pueden evaluar bajo condiciones de campo ni invernadero en nuestro país, por razones de seguridad del cultivo.

La infección exclusiva de G2333 por parte de aislamientos mesoamericanos obedece al proceso de co-evolución que se ha identificado en el patosistema *Phaseolus vulgaris* - *C. lindemuthianum*, en el cual las razas mesoamericanas son por lo general más patogénicas en genotipos mesoamericanos y las razas andinas son más patogénicas en genotipos andinos (Geffroy et al., 1999).

Los aislamientos patogénicos a los genes de resistencia cualitativos identificados en G2333, podrían evaluarse en institutos de investigación de países mesoamericanos o en regiones donde se hayan identificado estas razas y de esta manera se podría tener una evaluación fenotípica donde se evidencie la expresión de la resistencia cuantitativa.

Un número mayor de QTL se obtuvo al realizar el análisis con CIM, esta misma tendencia se ha identificado en otros estudios. Por ejemplo Nagabhushana et al., (2006) compararon los QTL obtenidos con CIM y mapeo de intervalo simple para las características de crecimiento y producción en arroz (*Oryza sativa* L.) y encontraron casi el doble de QTLs con el mapeo de intervalo compuesto. Aunque por lo general CIM se considera un modelo más preciso y adecuado para estimar la posición y el efecto de QTLs (Nagabhushana et al., 2006), en el presente estudio la mayoría de los QTLs identificados con mapeo por intervalo, también se identificaron con CIM y la posición de los QTL en los grupos de ligamiento se mantuvieron en ambos sistemas de mapeo. Los QTL identificados de manera simultánea por ambos modelos se pueden considerar estables.

El análisis de QTL que se realizó en la población RIL G2333 x G19839, permitió identificar genes mayores y menores para resistencia a diferentes razas de *C. lindemuthianum*. La varianza fenotípica explicada por los QTL identificados varió del 8 al 89%. Siete QTL pueden ser clasificados como mayores, puesto que explicaron más del 15% de la varianza fenotípica y los restantes QTL corresponden a QTL menores de acuerdo a la clasificación propuesta por Collard et al., (2005).

Dentro de los siete loci con las varianzas y valores LOD más altos se destacan el ANT8.1^{GG} y ANT8.2^{GG}, asociados con los marcadores SCAR SAS13 y SBB14, reportados

por estar ligados o hacer parte del locus Co-4 (Young et al., 1998; Awale y Kelly, 2001; Kelly et al., 2003). De esta manera la región telomérica del brazo corto del grupo de ligamiento b08 de frijol, se confirma como una región asociada con resistencia a antracnosis. A pesar de que el marcador SAS13 hace parte del locus Co-4, en trabajos previos donde se utilizó este marcador, se observaron algunos recombinantes; lo que lleva a la selección de falsos positivos y eliminación de plantas que pueden presentar el gen de interés (Garzón et al., 2008). Esto pone de manifiesto la posibilidad de usar adicionalmente el marcador SBB14 dentro de un programa de mejoramiento que utilice selección asistida. Este marcador cuenta con una ventaja adicional y es que permite discriminar los genotipos heterocigotos al ser un marcador co-dominante. Adicionalmente el marcador SBB14 estuvo asociado con resistencia a 6 de las 9 razas evaluadas, con varianzas fenotípicas entre de 9 y 34%, a diferencia del marcador SAS13 el cual explico un 89% de la resistencia, solamente frente a la raza 525, con las otras evaluaciones fenotípicas no se observó ninguna asociación.

En la región telomérica del brazo corto del grupo de ligamiento b01 se localizaron 2 QTL sugestivos que explican la resistencia frente a las razas 79 y 519. En esta región se localiza el gen *Co-1*, uno de los principales genes mayores de resistencia a antracnosis procedentes del acervo genético Andino (Kelly y Vallejo, 2004). Adicionalmente en este grupo se ha descrito: un QTL con resistencia a la raza 7 en la población BAT93 x JaloEEP558 (Geffroy et al., 2000), el gen de resistencia a roya *Ur-6* y los genes *fin* (hábito de crecimiento determinado) y *Ppd* (sensibilidad al fotoperiodo).

Uno de los principales resultados de este estudio fue la identificación de una región asociada con resistencia a antracnosis en el grupo b03. En este grupo de ligamiento se encontró el mayor número de QTL (siete en total) y estos loci explicaron la resistencia a seis de las nueve razas evaluadas en invernadero. Previamente solo se había identificado un QTL asociado con resistencia, específicamente a la raza 45 de *C. lindemuthianum* (Geffroy et al., 2000) y un RGA fue mapeado por López et al., (2003). En el presente trabajo, la mayoría de los loci asociados con resistencia, se identificaron en la región telomérica del brazo largo y todos los loci identificados en este grupo de ligamiento, provenían del parental G2333. Esta puede ser una región de interés para futuros trabajos de resistencia a antracnosis. Esto es un hallazgo importante, teniendo en cuenta que

Vallejo y Kelly (2009), propusieron la presencia de un cuarto gen en G2333, independiente de los genes *Co-4*², *Co-5*² y *Co-7*.

En el grupo de ligamiento b06 se identificaron 3 QTL, uno ellos explicó un 16% de la resistencia frente a la 133, con un valor LOD alto (2.48). Aunque hasta el momento no se ha reportado ningún gen de resistencia a antracnosis en este grupo de ligamiento, se han identificado genes con gran valor por la resistencia que confieren a otros patógenos. Dentro de ellos se destaca el gen *bc-3* asociado con resistencia al virus del mosaico común y el gen de resistencia a roya *Ur-4*. Adicionalmente se mapeo un loci que explicaba el 26.8% de la resistencia a *Thrips palmi* (Frei et al., 2005). Es de resaltar que los QTL localizados en este grupo provenían del parental G19839 lo que puede indicar que en este grupo hay regiones asociadas con resistencia provenientes del acervo genético Andino.

En el grupo de ligamiento b07 se identificó un loci que explicó el 11% de la resistencia frente a la raza 133. En este grupo de ligamiento han mapeado los genes de resistencia cualitativos *Co-5* y *Co-6* (Kelly et al., 2003; Campa et al., 2005). El gen *Co-5* mapeo en la región telomérica del brazo corto, flanqueado por los marcadores *Phs* (phaseolina) y *SAB3*, en la población derivada del cruce entre TU X MDRK (Campa et al., 2005); mientras que el gen *Co-6* mapeo entre los marcadores *Phs* y *P* (color básico) (Kelly y Vallejo, 2004). El loci identificado en este trabajo se localizó en el extremo opuesto, es decir en la parte terminal del brazo largo, por lo tanto corresponde a una región asociada con resistencia a antracnosis, diferentes a las reportadas anteriormente. Con dos genes de resistencia cualitativos reportados previamente y el QTL identificado en el presente trabajo, el grupo de ligamiento se confirma como una fuente importante de genes de resistencia a antracnosis. Es necesario continuar los trabajos para identificar genes más cercanos al *Co-5*, puesto que este es uno de los genes con mayor interés para los programas de mejoramiento en Colombia y en general en programas de mejoramiento de frijoles en la región Andina.

En varios trabajos relacionados con resistencia a diferentes enfermedades, se ha establecido el grupo b11 como uno de los grupos que contiene regiones asociadas con resistencia a múltiples patógenos. Por ejemplo en el trabajo realizado por Nodari et al., (1993b) se identificó una región asociada con resistencia parcial a bacteriosis común

(CBB por sus siglas en ingles: Common Bacterial Blight), Hanai et al., (2010) reportaron loci con resistencia a roya (*Uromyces appendiculatus*) y Geffroy et al., (2000), López et al. (2003), Hanai et al. (2010) y Rodríguez-Suárez et al., (2007) identificaron loci asociados con resistencia a antracnosis. Adicionalmente, es importante recordar que el locus Co-2 está localizado en la región telomérica del brazo largo (Adam-Blondon et al., 1994). Geffroy et al., (1998) y se ha identificado como un cluster importante en resistencia (Kelly et al., 2003; Kelly y Vallejo, 2004). En el presente trabajo se identificó el QTL ANT11.1^{GG} proveniente de G2333, es necesario realizar nuevas evaluaciones, puesto que sería una fuente importante de resistencia independiente de los genes de resistencia cualitativos que han sido reportados en este genotipo y adicionalmente confirmaría a este grupo de ligamiento como uno de los grupos que presentan cluster de genes que codifican resistencia a diferentes patógenos. La evidencia de resistencia a diferentes patógenos puede ser un efecto pleiotrópico de un locus o se puede deber a la presencia de un cluster con diferentes genes y especificidades.

El presente trabajo se realizó con la población derivada del cruce G2333 x G19839, la cual consta de 84 líneas endogámicas recombinantes. Dentro de los factores que definen el número de QTL identificados se encuentra el tamaño de la población utilizada para el mapeo (Beavis, 1994). Por esta razón algunos autores enfatizan la necesidad de utilizar grandes poblaciones, lo que permite una mayor precisión y aumentar las posibilidades de detección de QTL con efectos pequeños (Haley y Andersson, 1997). En frijol se han desarrollado diferentes poblaciones utilizadas para estudios de mapeo, dentro de las descritas con mayor frecuencia se encuentran la población RIL DOR364 x G19839 constituida por 87 líneas endogámicas (M. W. Blair, Pedraza, Buendia, et al., 2003^a) y la población core BAT93 x JaloEEP558 que cuenta con solo 74 líneas endogámicas (Nodari et al., 1993^a; b).

La población RIL G2333 x G19839, es especial para realizar estudios de QTL asociados con resistencia a antracnosis, puesto que los parentales exhiben una respuesta contrastante en las pruebas de patogenicidad con diferentes razas y además presentan un alto índice de polimorfismo dado por el *background* genético de cada parental que proviene de acervos genéticos diferentes. Adicionalmente la población cuenta con un mapa con un alto número de marcadores, lo que permitió la identificación de QTL de

interés con precisión en los marcadores flanqueantes. Los resultados obtenidos son una buena base para futuros proyectos de mapeo fino, donde se puede incrementar el tamaño de la población, o desarrollar líneas isogénicas (NILs: near isogenic lines).

La densidad de los marcadores a lo largo de los cromosomas (Noor et al., 2001) es otro factor que influye en el estudio de QTL. La evaluación, genotipificación y mapeo de los marcadores BMr permitió obtener un mapa más saturado, que se evidenció por la distancia en centimorgan entre marcadores adyacentes que en promedio tuvo un valor de 7.7cM. Esta saturación permitió identificar QTL asociados directamente a marcadores RGH-SSR o saturar regiones genómicas, en las cuales se localizaron QTL asociados a otro tipo de marcadores como SSR, SCAR y RAPD. El número óptimo de marcadores para realizar un estudio de QTL depende de la especie que se esté evaluando, el tamaño de su genoma, la correspondencia entre las distancias físicas y genéticas y el número y longitud de cromosomas (Collard et al., 2005). Se ha reportado una pequeña disminución en el poder de identificación de QTL solo cuando la distancia entre marcadores es superior a 20cM (Darvasi et al., 1993). Por lo tanto el número de marcadores y la distancia que presentan en el mapa G233 X G19839 fueron factores que permitieron la identificación de los QTL.

Uno de los factores necesarios para el uso de un marcador dentro de programas de selección asistida en mejoramiento es la co-segregación del marcador con la característica de interés o en su defecto una distancia pequeña (1 cM o menos) (Mohan et al., 1997). En este sentido los resultados obtenidos son un buen punto de partida para estudios de selección asistida y/o clonación posicional. El hecho de haber utilizado marcadores RGH-SSR es decir marcadores tipo microsatélite asociados con resistencia e identificados en las regiones terminales de clones BAC, permite conocer la localización física de estos marcadores (en el caso de BMr localizados en contigs) y limitar en algunos casos las regiones a ser evaluadas (Cordoba et al., 2010). Por ejemplo, se puede avanzar en la clonación y secuenciación de los clones en los cuales se ubicaron los RGH-SSR correspondientes a hit primarios y que estuvieron asociados con QTL para resistencia.

Para la identificación de regiones genómicas involucradas en la expresión de la resistencia cuantitativa, usualmente se realizan cruces entre materiales altamente resistentes (asumiendo que porta muchos alelos positivos, o que confieren resistencia) y

materiales altamente susceptibles (asumiendo que porta muchos alelos negativos, o que confieren susceptibilidad). Sin embargo, encontramos que QTL con efectos aditivos pueden ser identificados en los dos parentales, indicando que ambos parentales pueden contribuir con alelos para resistencia, lo que genera la posibilidad de observar en la progenie segregantes transgresivos, aunque también se puede presentar progenie más susceptible que los parentales, como se evidenció en algunas líneas. Por ejemplo, la línea RIL44 que fue altamente susceptible en todas las evaluaciones, inclusive en los ensayos en campo, puede considerarse un fenotipo extremo que exhibe segregación transgresiva hacia la susceptibilidad. Las plántulas de esta línea al ser inoculadas mostraron el valor más alto de susceptibilidad (9), con ocho de los nueve aislamientos evaluados, presentando necrosis severa y chancros cóncavos en el tallo, lo que condujo a la muerte de las plantas. La evaluación con la raza 79 dio un promedio de 7.8, también considerado altamente susceptible.

Este tipo de segregación transgresiva también se observó en otras líneas al ser inoculadas con las razas 129 y 651, para las cuales tanto el parental G2333 como G19839 presentaron altos valores de resistencia. En este caso, seis líneas endogámicas mostraron ser susceptibles en las evaluaciones con la raza 129, mientras que 17 líneas presentaron resistencia intermedia o susceptibilidad en la inoculación con la raza 651. Muchos factores se han propuesto para explicar la segregación transgresiva, dentro de estos se encuentran principalmente la recombinación entre genes independientes con efectos epistáticos, por ende, parece ser el resultado de acción génica complementaria de alelos aditivos que están dispersos en las líneas parentales, pero que se combinan en la progenie (Rieseberg et al., 1999).

El mapa G2333 x G19839 desarrollado, logró la genotipificación de 298 marcadores, de los cuales 155 corresponden a marcadores tipo RGH-SSR. Muchos marcadores microsatélite son utilizados como “marcadores de anclaje”, es decir, marcadores con un alto nivel de polimorfismo que pueden ser evaluados y mapeados en diferentes poblaciones y de esta manera se pueden correlacionar los resultados de mapeo determinando la sintenia y colinealidad de los marcadores en las poblaciones evaluadas (Blair et al., 2003).

Los marcadores RGH-SSR se obtuvieron a través de una estrategia específica para la identificación de genes de resistencia, por lo que fácilmente pueden ser utilizados en otras poblaciones de mapeo, para el estudio de resistencia a otros patógenos limitantes en frijol tales como: *Phaeoisariopsis griseola* causante de la mancha angular, *Phoma exigua* causante de ascochyta y *Uromyces appendiculatus* causante de roya, entre otros.

En los resultados más importantes de este estudio, los QTL identificados se encontraron asociados con resistencia a una o dos razas del patógeno, con excepción del loci asociado al marcador SBB14, el cual explicó cierto grado de la resistencia con seis razas diferentes. Una de las características que se había comúnmente utilizado para diferenciar la resistencia cualitativa y cuantitativa, era la interacción con las razas de patógeno de manera específica y de amplio espectro respectivamente. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que los QTL pueden ser específicos a determinadas razas y así mismo los genes de resistencia cualitativa pueden conferir resistencia a diferentes razas.

En el trabajo realizado por Geffroy et al. (2000),, mediante la evaluación de dos razas de *C. lindemuthianum* en la población RIL BAT93 x JaloEEP558 se identificaron 10 QTL de los cuales ocho mostraron una especificidad a cepas. Así mismo, en el estudio realizado por Cho et al., (2008) en el patosistema *Oryza sativa* - *Magnaporthe oryzae*, identificaron diez QTL que conferían resistencia de manera específica por razas. En otros cuatro QTL de arroz (*Pif*, *pi21*, *Pb1* y *Pi34*), se ha demostrado que la resistencia parcial es específica a razas (Revisado en Ballini et al., 2008). De esta manera en patógenos altamente variables como *C. lindemuthianum*, es necesario hacer una evaluación exhaustiva para determinar si la respuesta es específica, de amplio espectro o general, porque se puede concluir que es específica pero deberse a que la interacción con ciertas razas no fue evaluada.

Mediante el programa GMM, fue posible identificar la existencia de loci que afectan la respuesta de resistencia frente a ciertas razas de *C. lindemuthianum*, a través de interacciones entre sí. Una de las ventajas que presenta esta metodología es la detección del locus/alelo con el mayor efecto en la interacción (Isobe et al., 2007). La identificación

de este tipo de interacciones puede poner en evidencia locus que de manera individual no son reportados en estudio de mapeo de QTL, utilizando los modelos que no tienen en cuenta esta característica, y se puede estar subestimando el efecto de estas interacciones. Por ejemplo, Jannink (2007) identificó loci que tenían un efecto significativo en el fenotipo, solamente cuando interactuaba con otros loci. La identificación del alelo/locus con el mayor efecto en la interacción es clave para identificar redes de QTL en las cuales cada componente contribuye directamente al fenotipo final (Isobe et al., 2007).

Conclusiones

Para la identificación de QTL estables tanto los valores genotípicos como los fenotípicos, son importantes. En el caso de los datos genotípicos es necesario utilizar todas las herramientas disponibles para verificar los datos, corregir posibles errores y de esta manera obtener la mejor posición y orden de los marcadores. Este último parámetro debe tener una gran consideración, puesto que un mal ordenamiento de un marcador, puede generar asociaciones no verdaderas. En el caso de las evaluaciones fenotípicas de resistencia se debe definir muy bien la forma como se va a evaluar esta característica. Muchas veces se desconoce el tratamiento especial que se le debe dar a los valores obtenidos, como el uso de transformaciones o programas específicos y esto puede llevar a la identificación de QTL con valores subestimados o por el contrario QTLs que no existen.

El análisis de QTL para evaluaciones de resistencia /susceptibilidad, donde se utiliza una escala de evaluación ordinal, no se ha estudiado en detalle. Algunos autores consideran necesario realizar un cambio a porcentaje, otros utilizar transformación. Es necesario comparar los QTL generados con las diferentes alternativas antes de publicar un resultado.

El desarrollo de este proyecto permitió realizar un avance importante para programas de mejoramiento y fitopatología de frijol en la región Andina. Se saturó el mapa genético de la población RIL G2333 x G19839, una de las pocas poblaciones cuya base genética son genotipos con hábito de crecimiento voluble. Se mapeo un gran número de marcadores RGH-SSR (o BMr), que al ser una estrategia dirigida a la identificación de genes de resistencia, puede ser utilizada para la identificación de genes de resistencia a otros patógenos. Se confirmó el SCAR SBB14 como un marcador que puede ser utilizado en los programas de selección asistida, para mejorar la eficiencia cuando se utiliza el SAS13. Se identificaron regiones asociadas con resistencia que previamente no habían sido reportadas y se identificaron regiones asociadas con resistencia provenientes del genotipo G19839, estas sería una nueva fuente de resistencia a partir del acervo genético Andino.

Bibliografía

- Adam-Blondon, A.F., M. Sévignac, H. Bannerot, and M. Dron. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 88(6/7): 865–870.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology* Fifth edition, Academic Press. New York.
- Awale, H.E., and J.D. Kelly. 2001. Development of SCAR markers linked to Co-42 gene in common bean. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.* 44: 119–120.
- Balardin, R.S., A.M. Jarosz, and J.D. Kelly. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. *Phytopathology* 87(12): 1184–1191.
- Ballini, E., J.B. Morel, G. Droc, A. Price, B. Courtois, J.L. Notteghem, and D. Tharreau. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(7): 859–868.
- Beavis, W.D. 1994. The power and deceit of QTL experiments: Lessons from comparative QTL studies. In *Proceedings of the Forty-ninth Annual Corn and Sorghum Research Conference* (Washington, DC, American Seed Trade Association). 250–266.
- Beebe, S.E., and M.P. Corrales. 1991. Breeding for disease resistance. p. 561–617. In *CAB International*, Wallingford.
- Bertoli, D., S. Leal-Bertoli, M. Lion, V. Santos, G. Pappas, S. Cannon, and P. Guimarães. 2003. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 34–45.
- Blair, M., M. Giraldo, H. Buendía, E. Tovar, M. Duque, and S. Beebe. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 113(1): 100–109.
- Blair, M.W., F. Pedraza, H.F. Buendia, E. Gaitán-Solís, S.E. Beebe, P. Gepts, and J. Tohme. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris*; L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107: 1362–1374.
- Broughton, W.J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. 252(1): 55–128.
- Bryson, R.J., C.E. Caten, D.W. Hollomon, and J.A. Bailey. 1992. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*.

- Campa, A., C. Rodríguez-Suárez, A. Pañeda, R. Giraldez, and J.J. Ferreira. 2005. The bean anthracnose resistance gene Co-5, is located in linkage group B7. *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.* 48: 68–69.
- Campbell, C.L., and L.V. Madden. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. Wiley, 16 New York. Nueva York.
- Castanheira, A.L.M., J.B. dos Santos, D.F. Ferreira, and L.C. Melo. 1999. Identification of common bean alleles resistant to anthracnose using RAPD. *Genetics and Molecular Biology* 22(4): 565–569.
- Chacón, M.I., S.B. Pickersgill, D. Debouck, and J.S. Arias. 2007. Phylogeographic analysis of the chloroplast DAN variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematics and Evolution*.
- Checa, O., and M. Blair. 2008. Mapping QTL for climbing ability and component traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*; L.). *Molecular Breeding* 22: 201–215.
- Cho, Y.C., J.U. Jeung, H.J. Park, C.I. Yang, Y.H. Choi, I.B. Choi, Y.J. Won, S.J. Yang, and Y.G. Kim. 2008. Haplotype diversity and durability of resistance genes to blast in Korean Japonica rice varieties. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 11: 205–214.
- CIAT. 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Van Schoonhoven, A. and M.A. Pastor-Corrales (compilers). Cali, Colombia. 54 p.
- Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer, and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142(1/2): 169–196.
- Cordoba, J., C. Chavarro, J. Schlueter, S. Jackson, and M. Blair. 2010. Integration of physical and genetic maps of common bean through BAC-derived microsatellite markers. *BMC Genomics* 11(1): 436.
- Darvasi, A., A. Weinreb, V. Minke, J.I. Weller, and M. Soller. 1993. Detecting Marker-QTL Linkage and Estimating QTL Gene Effect and Map Location Using a Saturated Genetic Map. *Genetics* 134(3): 943–951.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. En: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Consulta: Noviembre, 2011.
- Fenalce. 2010. Indicadores sectoriales fríjol.
- Ferreira, M.E., S.R. Rimmer, P.H. Williams, and T.C. Osborn. 1995. Mapping loci controlling *Brassica napus* to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology* 85: 213–217.

- Frei, A., M.W. Blair, C. Cardona, S.E. Beebe, H. Gu, and S. Dorn. 2005. QTL Mapping of Resistance to Thrips palmi Karny in Common Bean. *Crop Sci.* 45(1): 379–387.
- Garcia, A.A.F., L.L. Benchimol, A.M.M. Barbosa, I.O. Geraldi, C.L. Souza Jr., and A.P. de Souza. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology* 27: 579 – 588.
- Garzón, L.N., M.W. Blair, O.A. Oliveros, B. Rosen, G.A. Ligarreto, J. Gao, and D. Cook. Submitted. Isolation and characterization of NBS resistance gene homologues in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology*.
- Garzón, L.N., G. Ligarreto, and M.W. Blair. 2008. Molecular Marker-Assisted Backcrossing of Anthracnose Resistance into Andean Climbing Beans (L.). *Crop Sci.* 48: 562–570.
- Geffroy, V., M. Sévignac, J.C.F. de Oliveira, G. Fouilloux, P. Skroch, P. Thoquet, P. Gepts, T. Langin, and M. Dron. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(3): 287–296.
- Geffroy, V., D. Sicard, J.C.F. de Oliveira, M. Sévignac, S. Cohen, P. Gepts, C. Neema, T. Langin, and M. Dron. 1999. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(9): 774–784.
- Gepts, P. 1998. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. 33(7): 1124–1130.
- Gepts, P., and D. Debouck. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 7–53. *In* CAB International, Wallingford.
- Gu, Y., Q. Han, W. Wang, S. Li, D. Sun, and F. Wu. 2011. Application of Common Bean Anthracnose Resistance Gene SCAR Markers in Snap Bean Disease Resistance Identification. *ACTA HORTICULTURAE SINICA* 38(5): 911.
- Guzmán, P., Donado, M.R., and Galvez, G.E. 1979. Pérdidas económicas causadas por la antracnosis del frijol *Phaseolus vulgaris* en Colombia. *Turrialba* 29: 65–67.
- Haley, C., and L. Andersson. 1997. Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals, pp. 49–71. *In*: P. Dear (Ed.), *Genome mapping—A practical approach*, Oxford University Press, New York.
- Hanai, L.R., L. Santini, L.E.A. Camargo, M.H.P. Fungaro, P. Gepts, Tsai SiuMui, and M.L.C. Vieira. 2010. Extension of the core map of common bean with EST-

- SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. *Molecular Breeding* 25(1): 25–45.
- Isobe, S., A. Nakaya, and S. Tabata. 2007. Genotype Matrix Mapping: Searching for Quantitative Trait Loci Interactions in Genetic Variation in Complex Traits. *DNA Research* 14(5): 217–225.
 - Kearsey, M.J., and A.G.L. Farquhar. 1998. QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity* 80(2): 137–142.
 - Keller, B., C. Feuillet, and M. Messmer. 2000. Genetics of Disease Resistance. Basic Concepts and Application in Resistance Breeding In: Slusarenko AJ, Fraser RSS, van Loon LC (Eds.) *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. pp .
 - Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas, and D.P. Coyne. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research* 82(2/3): 135–154.
 - Kelly, J.D., and V.A. Vallejo. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience* 39(6): 1196–1207.
 - López, C.E., I.F. Acosta, C. Jara, F. Pedraza, E. Gaitán-Solís, G. Gallego, S. Beebe, and J. Tohme. 2003. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93(1): 88–95.
 - Lorieux, M. 2012. MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding*, in press (DOI 10.1007/s11032-012-9706-y).
 - Mahuku, G., C. Jara, C. Cajiao, and S. Beebe. 2002. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. *Plant disease* 86(12): 1383–1387.
 - Mao, Y., and S. Xu. 2004. Mapping QTLs for traits measured as percentages. *Genet. Res., Camb.* 83: 159–168.
 - Martin, G.B., A.J. Bogdanove, and G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 54: 23–61.
 - Melotto, M., R.S. Balardin, and J.D. Kelly. 2000. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: “*Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction”. D. Prusky, S. Freeman, and M.B. Dickman (eds.), pp 346–361. APS Press, St Paul, MN, USA.

- Miklas, P.N. 2010. SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). http://www.css.msu.edu/bic/PDF/SCAR_Markers_2010.pdf (Verified Oct. 2011).
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia, and T. Sasaki. 1997. Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia & T. Sasaki, 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol Breed* 3: 87–103.
- Nagabhushana, K., S.P. Mane, and S. Hittalmani. 2006. Comparative studies on QTL mapping by simple interval mapping and composite interval mapping models for selected growth and yield traits in rice (*Oryza sativa* L.). 1(1-2): 97–101.
- Nodari, R.O., S.M. Tsai, R. Gilbertson, and P. Gepts. 1993a. Nodari RO, Tsai SM, Gilbertson RL, Gepts P (1993 a) Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. *Theor Appl Genet* 85: 513–520.
- Nodari, R.O., S.M. Tsai, P. Guzman, R.L. Gilbertson, and P. Gepts. 1993b. Toward an integrated map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacterial interactions. *Genetics* 134: 341– 350.
- Nodari, R.O., S.M. Tsai, P. Guzman, R. Gilbertson, and P. Gepts. 1993c. Nodari RO, Tsai SM, Guzmán P, Gilbertson RL, Gepts P (1993 b) Towards an integrated linkage map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacterium interactions. *Genetics* 134: 341–350.
- Noor, M.A.F., A.L. Cunningham, and J.C. Larkin. 2001. Consequences of recombination rate variation on quantitative trait locus mapping studies: simulations based on the *Drosophila melanogaster* genome. *Genetics and Molecular Biology* 159: 581–588.
- Ochoa, I.E., M.W. Blair, and J.P. Lynch. 2006. QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Crop Science* 46(4): 1609–1621.
- Paran, I., and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR of the manuscript based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85: 985–993.
- Pastor-Corrales, M.A., O.A. Erazo, E.I. Estrada, and S.P. Singh. 1994. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. *Plant Disease* 78(10): 959–962.
- Pastor-Corrales, M.A., G.A. Llano, L. Afanador, and G. Castellanos. 1985. Disease resistance mechanisms in beans to the anthracnose pathogen. (Abstr.). *Phytopathology* 75: 1176.

- del Peloso, M.J., A.A. Cardoso, C. Vieira, L.S. Saraiva, and M.J. de O. Zimmermann. 1989. Genetic system for the reaction of *Phaseolus vulgaris* to the BA-2 (α) race of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Revista Brasileira de Genética* 12(2): 313–318.
- Riascos, J. 2001. Caracterización de la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* usando marcadores moleculares. Trabajo de grado. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Cali, Colombia. 70 p.
- Rieseberg, L.H., M.A. Archer, and R.K. Wayne. 1999. Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83(4): 363–372.
- Rincon, R.L.J. 2007. Diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* que afecta frijol en las zonas productoras de los departamentos de Cundinamarca y Santander. Trabajo de grado M.Sc. en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, 90p.
- Rodríguez-Suárez, C., B. Méndez-Vigo, A. Pañeda, J. Ferreira, and R. Giraldez. 2007. A genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. and localization of genes for specific resistance to six races of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 114(4): 713–722.
- SAS. 2010. SAS Institute Inc. SAS/GRAPH® 9.2 Reference, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schafer. 1971. Tolerance to plant disease. *Annu. Rev Phytopathol* 9: 235–252.
- Van Schoonhoven, A., and M.A. Pastor-Corrales. 1987. Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm, Cali, Colombia, CIAT. pp. 56.
- Schwartz, H.F., J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster. 2005. Compendium of bean diseases. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul.
- Silva, M.V., and J.B. dos Santos. 2001. Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo Co-4(2) de resistência do feijoeiro comum ao agente causal da antracnose. *Revista Ciência e Tecnologia, Lavras- MG*, v. 25, n. 5, p. 1097-1104.
- Singh, S.P., R. Nodari, and P. Gepts. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. *Crop Science* 31(1): 19–23.
- Singh, S.P., and H.F. Schwartz. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science* 50(6): 2199–2223.
- Smith, J.S.C., E.C.L. Chin, H. Shu, O.S. Smith, S.J. Wall, M.L. Senior, S.E. Mitchell, S. Kresovich, and J. Ziegler. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and applied genetics* 95: 163–173.

- Steffenson, B.J., P.M. Hayes, and A. Kleinhofs. 1996. Genetic of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. sp. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in Barley. *Theoretical Applied Genetics* 92: 552–558.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27: 205–233.
- Vallejo, V., and J.D. Kelly. 2009. New insights into the anthracnose resistance of common bean landrace G 2333. *Open Horticulture Journal* 2: 29–33.
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93(1): 77–78.
- Young, N.D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34: 479–501.
- Young, R.A., and J.D. Kelly. 1996. Gene pyramiding using marker assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 39: 57–58.
- Young, R.A., M. Melotto, R.O. Nodari, and J.D. Kelly. 1998. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, “G2333”. *Theoretical and Applied Genetics* 96(1): 87–94.
- Zhang, H., Wang Y., Zhang, C., Wang, X., Li,H., and Xu W.. 2011. Isolation, characterization and expression analysis of resistance gene candidates in pear (*Pyrus* spp.). *Scientia Horticulturae* 127(3): 282–289.